

ÉTUDE DE LA MOBILITÉ D'UNE NOUVELLE CLASSE D'ÎLOTS GÉNOMIQUES
CHEZ LES VIBRIOS

par

Aurélié Daccord

thèse présentée au département de biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-93264-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-93264-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Le 17 janvier 2013

*le jury a accepté la thèse de Madame Aurélie Daccord
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Vincent Burrus
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Louis-Charles Fortier
Membre
Département de microbiologie et infectiologie

Monsieur Didier Mazel
Membre externe
Institut Pasteur Unité Plasticité du Génome Bactérien, France

Professeur Ryszard Brzezinski
Président rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Chaque année, de nombreux génomes bactériens sont séquencés et il devient de plus en plus évident que la participation des îlots génomiques à la plasticité bactérienne est prépondérante. Pourtant, bien que la définition même des îlots génomiques implique qu'ils aient été acquis par transfert horizontal, le mécanisme de transfert de nombre d'entre eux demeure inconnu. L'un des mécanismes employés par les îlots génomiques pour se transférer est le transfert conjugatif.

Le but de ce projet de recherche était d'étudier le mécanisme de mobilisation d'une nouvelle classe d'îlots génomiques, initialement identifiés dans les genres *Vibrio* et *Alteromonas*.

Les résultats obtenus ont permis la caractérisation d'un mécanisme de mobilisation inédit reposant sur la reconnaissance par un élément intégratif et conjugatif (ICE) d'une séquence similaire à son origine de transfert sur des îlots génomiques. Grâce à cette reconnaissance spécifique, ces îlots génomiques sont mobilisables par les ICE de la famille SXT/R391, retrouvés principalement chez *Vibrio*. Cette étude présente l'ensemble du mécanisme de mobilisation des îlots génomiques mobilisables (MGI) par les ICE SXT/R391 à partir de l'excision du chromosome de la cellule donneuse jusqu'à l'intégration dans le chromosome de la cellule réceptrice, en passant par l'initiation du transfert au niveau de l'origine de transfert et le transfert au travers du pore de conjugaison synthétisé par l'ICE. La diversité génétique de la famille des MGI a également été étudiée et apporte des précisions sur leurs rôles et leur possible origine évolutive.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord j'aimerais sincèrement remercier mon directeur de thèse, Vincent Burrus, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon doctorat dans son laboratoire. Je le remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi passionnant et original que celui des îlots génomiques mobilisables. Merci pour votre disponibilité et vos nombreux conseils tout au long de mon doctorat.

Je remercie chaleureusement les membres de mon comité de conseillers : Ryszard Brzezinski et Louis-Charles Fortier pour leurs conseils et leurs suggestions lors des réunions du comité. Je remercie également Didier Mazel qui a accepté d'évaluer et critiquer cette thèse ainsi que de faire le déplacement depuis la France afin de participer au jury d'évaluation en tant que membre externe. Merci à nos collaborateurs : Mauro M. Colombo (Università di Roma Sapienza, Rome, Italie) et Sébastien Rodrigue pour leur contribution dans la réalisation de ce projet.

Un très grand merci aux membres du laboratoire et amis qui m'ont épaulée tout au long de ce projet : Geneviève, Daniela, Gabi, Davina, Dominic, Eric, ... Merci à mes stagiaires pour leur aide technique.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, pour m'avoir permis de me rendre jusqu'ici, pour m'avoir encouragée à faire mes propres choix et m'avoir soutenue dans ma décision de poursuivre mes études au Québec.

Et pour finir, un immense merci à mon mari Christian, qui m'a suivie tout au long du doctorat, m'a encouragée dans les mauvais moments, félicitée dans les bons et qui me porte toujours une oreille attentive quand j'en ai besoin.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	viii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1. Les bactéries des genres <i>Vibrio</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> et <i>Methylophaga</i> 2	
1.1.1. Le genre <i>Vibrio</i>	2
1.1.1.1. Généralités.....	2
1.1.1.2. Espèces	3
1.1.1.3. Habitat	3
1.1.1.4. Pouvoir pathogène	5
1.1.1.4.1. Le choléra	5
1.1.1.4.1.1. Généralités	5
1.1.1.4.1.2. Pathogenèse	5
1.1.1.4.1.3. Epidémiologie.....	6
1.1.1.4.2. Infections non cholériques.....	7
1.1.1.4.2.1. <i>Vibrio vulnificus</i>	8
1.1.1.4.2.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9
1.1.1.4.2.3. <i>Vibrio fluvialis</i>	10
1.1.1.4.3. Infections chez les animaux.....	11
1.1.2. Les genres <i>Alteromonas</i> et <i>Pseudoalteromonas</i>	11
1.1.3. Le genre <i>Methylophaga</i>	12
1.2. Les îlots génomiques	12
1.2.1. Généralités.....	12
1.2.2. Structure	14
1.2.3. Fonctions	16
1.2.3.1. Îlot de pathogénicité	16
1.2.3.2. Îlot de symbiose.....	16

1.2.3.3. Îlot de métabolisme	16
1.2.3.4. Îlot de résistance	17
1.2.4. Mobilité des îlots génomiques.....	17
1.2.4.1. Notion de transfert horizontal.....	17
1.2.4.2. Ilots génomiques transférables par eux-mêmes.....	19
1.2.4.2.1. Prophages	19
1.2.4.2.2. Les ICE	19
1.2.4.3. Ilots génomiques non transférables par eux-mêmes.....	23
1.2.4.3.1. Généralités	23
1.2.4.3.2. Les HPI chez <i>Yersinia</i> sp.	25
1.2.4.3.3. Les SaPI chez <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.2.4.3.4. Les NBU chez <i>Bacteroides</i> sp.	28
1.2.4.3.5. L'îlot SGI1 chez <i>Salmonella</i>	29
1.2.4.3.6. Les CIME chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	30
1.3. Les ICE de la famille SXT/R391.....	31
1.3.1. Définition / Structure	31
1.3.2. Distribution.....	32
1.3.3. Mécanisme de transfert de SXT	34
1.3.3.1. Excision et intégration.....	34
1.3.3.2. Transfert conjugatif	36
1.3.4. Régulation et maintenance.....	37
1.3.5. Rôle dans la plasticité génomique	38
1.4. Hypothèse générale du projet de doctorat	39
CHAPITRE 2. RÉSULTATS.....	41
2.1. Les ICE de la famille SXT/R391 induisent l'excision et mobilisent une nouvelle classe d'îlots génomiques chez <i>Vibrio</i>	41
2.2. Régulation de l'intégration et de l'excision des MGI par les ICE de la famille SXT/R391	84
2.3. Diversité génétique des MGI, une famille largement répandue	119
CHAPITRE 3. DISCUSSION	161
3.1. Mécanisme et régulation de l'excision, du transfert et de l'intégration des MGI ...	163
3.2. Mobilisation d'ADN chromosomique et impact sur l'évolution des génomes bactériens	168

3.3. Avantages sélectifs conférés par les MGI	170
3.4. Perspectives du projet.....	171
CONCLUSION	175
BIBLIOGRAPHIE	176

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.	Les infections non-cholériques causées par les principales espèces du genre <i>Vibrio</i>	8
2.	Exemple de la diversité et de la prévalence des ICE chez les eubactéries	22

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

Tableaux dans l'article: "Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* Genomic Islands"

1.	Strains and plasmids used in this study	69
S1.	MGIV _{ch} USA1 from <i>V. cholerae</i> RC385	76
S2.	MGIV _{vu} Tail1 from <i>V. Vulnificus</i> YJ016	77
S3.	Primers used in this study	78

Tableaux dans l'article: "Dynamics of the SetCD-regulated integration and excision of Genomic Islands mobilized by Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family"

1.	Strains and plasmids used in this study	92
----	---	----

2.	DNA sequences of the primers used in this study	94
----	---	----

Tableaux dans l'article: "Comparative Analysis of Mobilizable Genomic Islands"

1.	Strains and plasmids used in this study	124
2.	Properties of MGI-like elements	130
S1.	DNA sequences of the primers used in this study	157
S2.	Content of the variable regions	158
S3.	Strains harboring integrases related to Int _{MGI}	160

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.	Cycle de vie des principales espèces du genre <i>Vibrio</i>	4
2.	Principaux facteurs de virulence de <i>V. cholerae</i> ainsi que leurs régulateurs	6
3.	Les différents types d'îlots génomiques	13
4.	Caractéristiques générales d'un îlot génomique	15
5.	Mécanisme de transfert d'un ICE	21
6.	Hypothèse sur l'origine des îlots génomiques	24
7.	Structure et organisation des HPI	25
8.	Observation de particules phagiques et de particules contenant la séquence de SaPI _{bov1} par microscopie électronique	27
9.	Modèle de l'induction de l'excision et de la mobilisation des NBU par les ICE	28
10.	Modèle de la mobilisation d'un CIME par un ICE	30
11.	Représentation du squelette commun des ICE de la famille SXT/R391 et	32

des régions variables de différents ICE de cette famille

12.	Distribution mondiale des ICE de la famille SXT/R391	33
13.	Excision de SXT par recombinaison site-spécifique entre les séquences <i>attL</i> et <i>attR</i>	35
14.	Régulation du transfert des ICE de la famille SXT/R391	37

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

Figures dans l'article: "Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* Genomic Islands"

1.	A sequence related to the <i>oriT</i> of SXT/R391 ICEs is found in GIs	49
2.	Recognition of <i>oriT</i> of the MGIs by the conjugative machinery of SXT/R391 ICEs	52
3.	Genetic requirements for mobilization of MGIV/Ind1	54
4.	<i>Hfr</i> -like mobilization of chromosomal DNA by MGIV/Ind1 driven by ICEV/Ind1	58
5.	ICEs of the SXT/R391 family trigger the site-specific excision of the MGIs	60
6.	Model of ICE-mediated mobilization of an MGI	66

Figures dans l'article: "Dynamics of the SetCD-regulated integration and excision of Genomic Islands mobilized by Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family"

1. Schematic representation of the core sets of conserved genes of SXT/R391 ICEs and MGIs 89
2. Genetic requirements for integration and excision of a replication-deficient plasmid containing the *attP* site of MGIV/Ind1 99
3. Sequence alignment of the translation products of *cds9*_{MGIV_{vu}Tai1} and *cds9*_{MGIV_{ch}USA1} with related RDFs 102
4. Genetic requirements for excision and transfer of MGIV/Ind1 103
5. Regulation of the expression of integration and excision genes of MGIs and SXT/R391 ICEs 106
6. *int*_{MGI} has a basal level of expression in absence of SetCD 108
7. Integration and excision dynamics of MGIs in donor and recipient cells 110

Figures dans l'article: "Comparative Analysis of Mobilizable Genomic Islands"

1. MGI capture system 132

2.	General structures of MGIs and phylogenetic analyses of the core genes	135
3.	Phylogenetic analysis of the MGI backbone	138
4.	Phylogenetic analysis of MGIs and related GIs	141
5.	Excision of MGIs and related GIs	143
S1.	Comparison of <i>oriTs</i> in MGIs and SXT	154
S2.	Attachment sites of the MGIs	155
S3.	Alignment of the attachments sites of MGI <i>AmaMed1</i>	156

CHAPITRE 3. DISCUSSION

1.	Facteurs de virulence potentiels chez <i>V. vulnificus</i> YJ016	169
----	--	-----

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Afin de replacer les îlots génomiques mobilisables (MGI) dans leur contexte écologique, la première partie de l'introduction s'intéressera aux différents genres bactériens dans lesquels des MGI ont été identifiés. Une deuxième partie portera ensuite sur les îlots génomiques en termes de structure, fonction et mobilité. Finalement, une dernière partie sera consacrée aux éléments intégratifs et conjugatifs (ICE) de la famille SXT/R391.

1.1. Les bactéries des genres *Vibrio*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* et *Methylophaga*

1.1.1. Le genre *Vibrio*

1.1.1.1. Généralités

Le genre *Vibrio* regroupe des bacilles, généralement incurvés, de gram négatif. Ce genre fait partie de la famille des Vibrionaceae, et de la classe des gammaprotéobactéries ; classe regroupant plusieurs autres familles d'importance médicale, telles que les Enterobacteriaceae et Pseudomonadaceae. Les *Vibrio* sont mobiles grâce à un unique flagelle polaire. Une caractéristique intéressante partagée par de nombreuses espèces de *Vibrio* est la présence de deux chromosomes de taille inégale. La majorité des fonctions essentielles sont codées par des gènes situés sur le chromosome I. Le chromosome II, plus petit, possède surtout des gènes codant pour des fonctions plus spécialisées (Reen *et al.*, 2006). D'après Heidelberg, le deuxième chromosome était un méga plasmide probablement acquis avant même la différenciation de la famille des Vibrionaceae (Heidelberg *et al.*, 2000). Cette hypothèse s'appuie sur plusieurs arguments : par exemple l'analyse phylogénétique des homologues de la protéine ParA (protéine nécessaire à la ségrégation des chromosomes lors des divisions cellulaires) montre que la protéine ParA du chromosome I est apparentée à d'autres ParA chromosomiques tandis que la protéine ParA du chromosome II semble plus apparentée à des ParA de plasmides, phages et mégaplasmites. Par ailleurs le chromosome I possède tous les ARN ribosomiaux et au moins une copie de chaque ARN de transfert. Toujours d'après cette étude, la relocalisation de certaines fonctions essentielles sur le futur chromosome II aurait achevé la capture stable du mégaplasme.

1.1.1.2. Espèces

Il est difficile de classer de façon irréprochable les procaryotes en raison de leur évolution constante et rapide à la fois par mutation et par transfert horizontal de matériel génétique. Les génomes des bactéries du genre *Vibrio* sont connus pour être fréquemment sujets à d'importants échanges de matériel génétique. La famille Vibrionaceae comporte actuellement 130 espèces appartenant à sept genres différents, dont les principaux sont *Vibrio*, *Aliivibrio* et *Photobacterium* (Kahlke *et al.*, 2012; Thompson et Swings, 2006).

1.1.1.3. Habitat

Les *Vibrio* sont des bactéries aquatiques généralement halophiles, on les retrouve donc aussi bien dans les eaux douces qu'au sein des mers et des océans. Elles peuvent adopter une grande variété de niches écologiques. Certaines espèces peuvent vivre sous forme libre dans l'eau, coloniser les poissons, ou s'établir à la surface des crustacés en produisant du biofilm. Les *Vibrio* ne sont pas toujours pathogènes, et certaines espèces, telles que *V. fischeri*, peuvent vivre en symbiose avec le calmar (Fig. 1.).

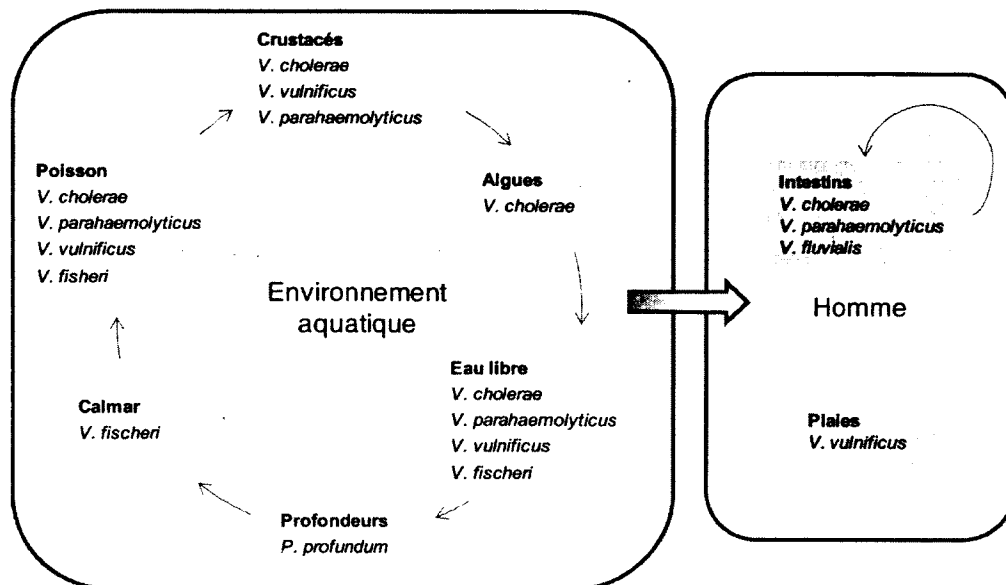


Figure 1. Cycle de vie des principales espèces du genre *Vibrio*. Adapté de (Reen *et al.*, 2006).

L'adaptation des *Vibrio* aux paramètres changeant de leur environnement aussi bien aquatique, qu'à l'intérieur de leur hôte est cruciale pour la colonisation et leur survie. Un facteur clef de leur survie est leur habilité à produire du biofilm. La croissance en biofilm est un mode de vie essentiel dans le monde microbien. Le biofilm augmente la croissance et la survie en fournissant un accès aux nutriments et une protection contre les prédateurs et les composés antimicrobiens (Donlan et Costerton, 2002). La capacité de *Vibrio cholerae* à former du biofilm est bien documentée, aussi bien en milieu naturel qu'en conditions de laboratoire (Faruque *et al.*, 1998; Watnick et Kolter, 1999; Yildiz et Schoolnik, 1999). Par exemple, les selles de patients atteints de choléra ne contiennent pas seulement la forme planctonique de *V. cholerae* mais aussi des agrégats qui se révèlent plus infectieux (Faruque *et al.*, 2006). Par ailleurs, éliminer les particules de plus de 20 μm de diamètre de l'eau peut réduire l'incidence du choléra de 48% (Colwell *et al.*, 2003). Ces études montrent l'importance du biofilm dans le cycle de vie de *V. cholerae*.

1.1.1.4. Pouvoir pathogène

1.1.1.4.1. Le choléra

1.1.1.4.1.1. Généralités

Le choléra est causé par la première espèce découverte du genre *Vibrio* : *V. cholerae*. Elle a été décrite pour la première fois comme agent causal du choléra par l'italien Filippo Pacini en 1854. Les plus anciens cas décrits de choléra remontent aux années 460-377 avant J.C. (Blake, PA. 1994. ASM). Le choléra touche principalement les pays sous développés ou en voie de développement où les conditions sanitaires ne sont pas adéquates. L'infection, caractérisée par une diarrhée survenant brutalement, se contracte par ingestion d'eau ou de nourriture contaminées. L'importante perte d'eau (jusqu'à 15L par jour) peut entraîner une déshydratation sévère ainsi qu'une carence en sels minéraux. Le traitement est simple, il consiste à réhydrater le patient à l'aide d'une perfusion. Des traitements antibiotiques peuvent également être employés et réduisent la durée et l'intensité des symptômes. Sans traitement le taux de mortalité du choléra atteint 50-60%. Le choléra affecte encore aujourd'hui 3 à 5 million de personnes par an, et fait environ 120 000 morts chaque année (Harris *et al.*, 2012).

1.1.1.4.1.2. Pathogenèse

Toutes les souches de *V. cholerae* ne provoquent pas le choléra, seules les souches capables de produire la toxine cholérique et porteuses de l'antigène O1 ou O139 peuvent causer la maladie. La pathogenèse du choléra est un phénomène complexe qui met en jeu de nombreux facteurs. Ces facteurs vont permettre à la bactérie d'atteindre et de coloniser l'épithélium de l'intestin grêle ainsi que de produire l'entérotoxine à l'origine de la

perturbation du transport d'ions par les cellules épithéliales (Faruque *et al.*, 1998). Les deux principaux facteurs de virulence de *V. cholerae* sont l'opéron *ctxAB*, codant pour les deux sous unités de la toxine cholérique et l'opéron *tcp* (toxin-coregulated pilus), responsable de la formation d'un pilus nécessaire pour la colonisation de la muqueuse intestinale (Fig. 2.). Fait intéressant, ces deux opérons importants pour la virulence sont chacun situés sur un îlot génomique différent. En effet l'opéron *ctxAB* fait partie du génome du phage CTX ϕ et l'opéron *tcp* est situé sur l'îlot de pathogénicité VPI (« *Vibrio* Pathogenicity Island »). De plus le pilus codé par l'opéron *tcp* est strictement requis pour que la souche soit sensible à une infection par CTX ϕ . ToxR est le principal régulateur de la virulence de *V. cholerae*, il est lui même régulé par des signaux environnementaux. ToxR active l'expression de *toxT* (situé sur VPI) ainsi que de l'opéron *ctxAB*. ToxT active également l'expression de *ctxAB* mais aussi l'opéron *tcp* (Faruque *et al.*, 1998).

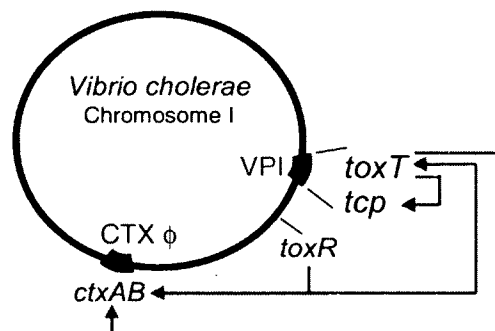


Figure. 2. Principaux facteurs de virulence de *V. cholerae* ainsi que leurs régulateurs.

1.1.1.4.1.3. Epidémiologie

Sept pandémies de choléra ont été observées de 1817 à 1992 (Kaper *et al.*, 1995). Jusqu'en 1992, *V. cholerae* O1 était le seul agent connu du choléra. L'agent causal des six premières pandémies était *V. cholerae* O1 biotype 'classique', et la 7^{ème} pandémie (débutée en 1961 et

toujours en cours) a vu l'émergence d'un nouveau biotype : *V. cholerae* O1 'El Tor'. En 1992, une souche épidémique appartenant à un nouveau sérotype, le sérotype O139, est apparue en Inde et au Bangladesh (Faruque *et al.*, 2003). La principale hypothèse pour expliquer l'émergence de cette souche repose sur l'acquisition des gènes codant pour l'antigène O139 par une souche O1 'El Tor'. Les gènes codant pour l'antigène O1 auraient été remplacés par ceux codant pour O139 par recombinaison homologue entre les régions adjacentes. Une étude récente a démontré que cette conversion était possible et ce dans un environnement proche de l'environnement naturel des vibrios, c'est à dire dans une condition de biofilm à la surface de carapaces de crabes (Blokesch, 2007). La présence des principaux facteurs de virulence sur des éléments génétiques potentiellement mobiles laisse penser que les souches environnementales constituent un réservoir et peuvent, par le jeu du transfert horizontal, devenir pathogènes.

1.1.1.4.2. Infections non cholériques

Les autres infections causées par les espèces du genre *Vibrio* sont dites « non cholériques » et sont causées par les souches de *V. cholerae* non-O1 et non-O139 ainsi que d'autres espèces du genre *Vibrio*, dont les principales sont *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. fluvialis*. Le type d'infection diffère selon les espèces concernées (Tableau 1.).

Tableau 1. Les infections non-cholériques causées par les principales espèces du genre *Vibrio*. Adapté de (Juhas *et al.*, 2009)

Espèce	Gastroentérite (%)	Infection plaies (%)	Septicémie (%)	Autres (%)
<i>V. parahaemolyticus</i>	59	34	5	2
<i>V. vulnificus</i>	5	45	43	7
<i>V. cholerae</i> non-O1 et non-O139	67	9	15	...
<i>V. fluvialis</i>	73	10	6	...

1.1.1.4.2.1. *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus est un pathogène humain opportuniste ayant un taux élevé de mortalité, il est responsable de la majorité des cas rapportés de mort par infection alimentaire aux fruits de mer aux États-Unis (Feldhusen, 2000; Oliver et Kaper, 2007). Cette bactérie fait partie de la flore naturelle des côtes marines du monde entier, elle a été isolée de l'eau, de sédiments, et d'une variété de fruits de mer (Baffone *et al.*, 2006; Bisharat *et al.*, 1999; DePaola *et al.*, 1994; Hoi *et al.*, 1998; Mahmud *et al.*, 2008; Myatt et Davis, 1989; O'Neill *et al.*, 1992; Oliver, 2006; Tamplin *et al.*, 1982; Wright *et al.*, 1996). Les souches de *V. vulnificus* sont classés en trois biotypes selon leurs caractéristiques biochimiques et ce sont principalement les souches du biotype I qui causent les infections chez l'humain (Jones et Oliver, 2009). La consommation de fruits de mer contenant *V. vulnificus* peut entraîner une septicémie sévère, particulièrement chez les personnes immunodéprimées. C'est l'infection la plus létale causée par ce pathogène, le taux de mortalité moyen dépasse les 50% (Feldhusen, 2000; Hlady et Klontz, 1996). D'autre part, *V. vulnificus* peut entraîner de

sérieuses infections des plaies, résultant de l'exposition d'une plaie à de l'eau contenant la bactérie (Oliver, 2005).

La capacité de *V. vulnificus* à causer des infections est due à de nombreux facteurs de virulence, dont le principal reconnu est la présence d'une capsule. Sa présence permet la résistance à l'opsonisation par le complément et par conséquent permet d'éviter la phagocytose par les macrophages. Par ailleurs, lorsque la bactérie est ingérée, elle est capable de résister aux acides gastriques en tamponnant le faible pH, notamment grâce à une lysine décarboxylase, codée par l'opéron *cadBA* (Rhee *et al.*, 2002). D'autres facteurs semblent jouer un rôle important dans la pathogénicité de *V. vulnificus*, notamment plusieurs systèmes d'acquisition du fer dont le principal est la vulnibactine (Alice *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006). La mobilité, due à un flagelle, l'adhésion et la cytotoxicité semblent par ailleurs des facteurs liés pour permettre la virulence de la bactérie (Lee *et al.*, 2004).

1.1.1.4.2.2. *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus est l'agent pathogène le plus souvent isolé lors de gastroentérites associées à la consommation de fruits de mer aux États-Unis. Il peut également causer de sévères infections des plaies (Daniels *et al.*, 2000a; Daniels *et al.*, 2000b; Ralph et Currie, 2007). Les différents isolats sont classés en fonction des antigènes O et K, il existe 13 antigènes O et 71 K identifiables grâce aux antiséras commerciaux (Iguchi *et al.*, 1995). Plusieurs sérogroupes peuvent entraîner des gastroentérites, mais depuis 1995 un isolat est particulièrement virulent : la souche O3:K6 (Okuda *et al.*, 1997b). Toutes les souches pathogènes non O3:K6 isolées depuis l'apparition de cette souche très virulente sont très proches génétiquement de cette dernière (Chowdhury *et al.*, 2000; Chowdhury *et al.*, 2004; DePaola *et al.*, 2000; Martinez-Urtaza *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 1997a; Okura *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2000).

La plupart des isolats de *V. parahaemolyticus* ne sont pas pathogènes (Joseph *et al.*, 1982). Les isolats cliniques produisent généralement une hémolysine thermostable (TDH) et/ou une hémolysine homologue (TRH), codées respectivement par les gènes *tdh* et *trh*. Plusieurs études suggèrent que ces gènes ont été acquis par transfert horizontal (Nishibuchi et Kaper, 1995; Park *et al.*, 2000). En outre les isolats cliniques possèdent une hémolysine thermolabile (codée par le gène *tlh*), deux systèmes de sécrétion de type III, ainsi que des facteurs nécessaires à l'adhésion et à l'invasion des entérocytes (Park *et al.*, 2004; Yeung et Boor, 2004; Zhang et Austin, 2005).

1.1.1.4.2.3. *Vibrio fluvialis*

L'espèce *V. fluvialis* a été identifiée pour la première fois en 1975 à partir d'un patient atteint de diarrhée, à Bahrain. Elle a tout d'abord été identifiée comme 'vibrio du groupe F' pour être ensuite nommée *V. fluvialis* (Furniss *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 1980). La gastroentérite causée par cette espèce est cliniquement identique au choléra (Bellet *et al.*, 1989; Huq *et al.*, 1980). Peu d'informations sont disponibles sur ce pathogène humain car les recherches se tournent en grande majorité vers *V. cholerae*, plus fréquemment isolé. Le génome complet d'aucune souche de *V. fluvialis* n'est encore disponible. Cependant depuis quelques années *V. fluvialis* est de plus en plus souvent isolé de patients atteints de symptômes cholériques, et nombre des souches isolées présentent une grande variété de résistances à des antibiotiques (Ahmed *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2006).

1.1.1.4.3. Infections chez les animaux

Les vibrios sont d'importants pathogènes pour les élevages de poissons et crustacés en aquaculture (Austin et Austin, 1999; Hjeltne et Roberts, 1993; Lightner et Redman, 1998). *V. anguillarum*, *A. salmonicida* et *V. vulnificus* sont parmi les pathogènes principaux de nombreuses espèces de poisson (Austin et Austin, 1999) ; *V. nigripulchritudo* et *V. harveyi* sont des pathogènes de la crevette (Austin *et al.*, 2003; Lavilla-Pitogo et de la Peña, 1998; Le Roux *et al.*, 2011; Leano *et al.*, 1998; Reynaud *et al.*, 2008).

1.1.2. Les genres *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas*

Les genres *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas* appartiennent tous deux à la famille Alteromonadaceae, qui appartient également à la classe des gammaprotéobactéries. Ces genres regroupent, tout comme le genre *Vibrio*, des bacilles incurvés de gram négatif et possédant un unique flagelle polaire. La famille des Alteromonadaceae est très proche de celle des Vibrionaceae et certaines espèces décrites comme appartenant à cette dernière ont été démontrées comme appartenant à la famille Alteromonadaceae à la suite d'analyses de l'ARNr 5S (MacDonnell et Colwell, 1985).

Le genre *Alteromonas* représente une grande partie des bactéries hétérotrophiques vivant dans les mers ouvertes et les océans (Garcia-Martinez *et al.*, 2002). L'espèce *A. macleodii* se divise en deux écotypes : celui de « surface », représenté par *A. macleodii* ATCC 27126, et celui de « profondeur », représenté par *A. macleodii* 'Deep Ecotype'. *A. macleodii* 'Deep Ecotype' a été isolée en 2003 à 1000m de profondeur dans la mer Méditerranée et son génome est entièrement séquencé (Ivars-Martinez *et al.*, 2008).

Les espèces du genre *Pseudoalteromonas* étaient considérées jusqu'en 1995 comme des espèces du genre *Alteromonas*. En 1995, une étude a montré que *Pseudoalteromonas*

piscicida ainsi que 12 autres espèces du genre *Alteromonas* formaient un groupe phylogénétique homogène et distinct pour lequel a été validée la nomenclature de *Pseudoalteromonas* (Gauthier *et al.*, 1995). Certaines espèces de ce genre sont pathogènes pour les poissons et les crustacés. Par ailleurs, d'autres espèces présentent un intérêt pharmaceutique de part leur production de composés ayant une activité antibiotique. C'est le cas de *P. phenolica*, qui produit un composé ayant une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Isnansetyo et Kamei, 2009).

1.1.3. Le genre *Methylophaga*

Tout comme les genres *Vibrio*, *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas*, le genre *Methylophaga* appartient à la classe des gammaproteobacteries. Le genre *Methylophaga*, décrit en 1995, regroupe des bactéries marines méthylotrophes, c'est-à-dire qui peuvent utiliser des substances carbonées réduites ne possédant aucune liaison carbone-carbone comme seule source de carbone et d'énergie (Janvier et Grimont, 1995). Les bactéries méthylotrophes sont ubiquitaires dans la nature et jouent un rôle important dans le cycle du carbone (Kim *et al.*, 2012).

1.2. Les îlots génomiques

1.2.1. Généralités

Un îlot génomique, au sens large, est un segment d'ADN distinct présent seulement dans certaines souches d'une même espèce et auquel on attribue généralement des propriétés de mobilité passées ou présentes (Juhas *et al.*, 2009). Cette définition met en jeu une grande variété de familles d'éléments avec des modes de maintenance et de propagation très différents (Fig. 3).

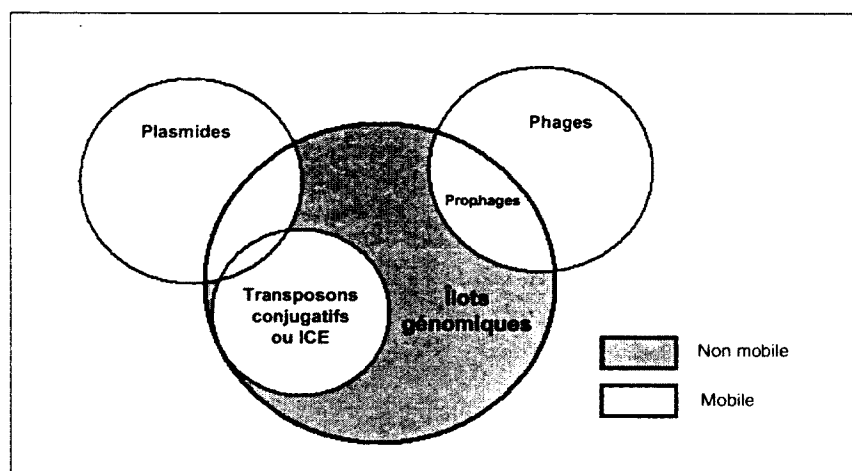


Figure 3. Les différents types d'îlots génomiques. La catégorie des îlots génomiques comprend d'autres catégories d'éléments tels que les ICE, les plasmides intégratifs et les prophages. Adapté de (Juhas *et al.*, 2009).

Historiquement ce sont d'abord les îlots génomiques dits « de pathogénicité » qui ont été découverts par J. Hacker qui s'intéressait aux facteurs de virulence d'isolats uropathogènes de *Escherichia coli* (Hacker *et al.*, 1990). Les îlots découverts étaient d'instables régions chromosomiques associées à différents phénotypes de virulence (Groisman et Ochman, 1996). Aujourd'hui, on sait que les îlots génomiques représentent une bien plus grande et variée famille d'éléments génétiques, avec une grande diversité de tailles et d'abondance dans les génomes bactériens (Dobrindt *et al.*, 2004).

De par leur présence dans certaines souches seulement au sein d'une espèce, les îlots génomiques participent à la plasticité des génomes bactériens. Par exemple, la souche clinique *V. vulnificus* YJ016, isolée d'un patient à Taiwan en 1992, possède sur son chromosome I neuf îlots génomiques dont la taille varie de 19 à 117 kpb. Ces îlots génomiques sont pour la plupart propres à cette souche, et représentent 8,5% du chromosome (Quirke *et al.*, 2006). Dans le génome de la souche *A. macleodii* 'Deep

Ecotype', treize îlots génomiques de taille supérieure à 20 kpb ont été décrits, ils regroupent 472 gènes et représentent 10,9% du génome (Ivars-Martinez *et al.*, 2008).

Par ailleurs, une étude bioinformatique a montré que les îlots génomiques possèdent généralement plus de gènes nouveaux (c'est à dire n'ayant pas d'orthologues dans d'autres espèces) que le reste du génome (Hsiao *et al.*, 2005).

1.2.2. Structure

En règle générale un îlot génomique comprend les caractéristiques suivantes (Fig. 4) :

- (1) C'est un large fragment d'ADN, généralement situé entre 10 et 200 kpb, souvent détecté par comparaison génomique entre différentes souches génétiquement proches. Lorsque la taille est inférieure à 10 kpb on les nomme « îlots génomiques » (Hacker et Kaper, 2000).
- (2) Il peut être détecté par l'analyse de statistiques nucléotidiques (% GC, utilisation des codons), car leurs caractéristiques sont souvent distinctes du reste du chromosome.
- (3) Un îlot génomique est souvent inséré au niveau d'un gène codant pour un ARN de transfert (ARNt).
- (4) Un îlot génomique est souvent flanqué de séquences répétées parfaites ou presque parfaites d'environ 16-20 pb. Ces séquences sont le résultat de l'insertion site-spécifique de l'îlot dans sa séquence cible et peuvent éventuellement servir à l'excision de ce dernier (Schmidt et Hensel, 2004).

- (5) Un îlot génomique présente généralement des gènes fonctionnels ou cryptiques codant pour des intégrases et/ou des protéines de mobilité d'origine plasmidique ou phagique et permettant parfois le transfert de l'îlot.
- (6) Un îlot génomique possède souvent des séquences d'insertion (IS) ou des transposons, qui peuvent avoir été impliqués dans la mobilisation de matériel génétique à partir de l'îlot ou vers celui-ci (Buchrieser *et al.*, 1998; Gal-Mor et Finlay, 2006).
- (7) Généralement un îlot génomique possède des gènes qui confèrent un avantage sélectif pour la bactérie qui le possède. En fonction du type d'avantage conféré, l'îlot peut prendre le nom d'îlot de pathogénicité, de symbiose, de métabolisme, de fitness ou de résistance (Dobrindt *et al.*, 2004; Schmidt et Hensel, 2004).

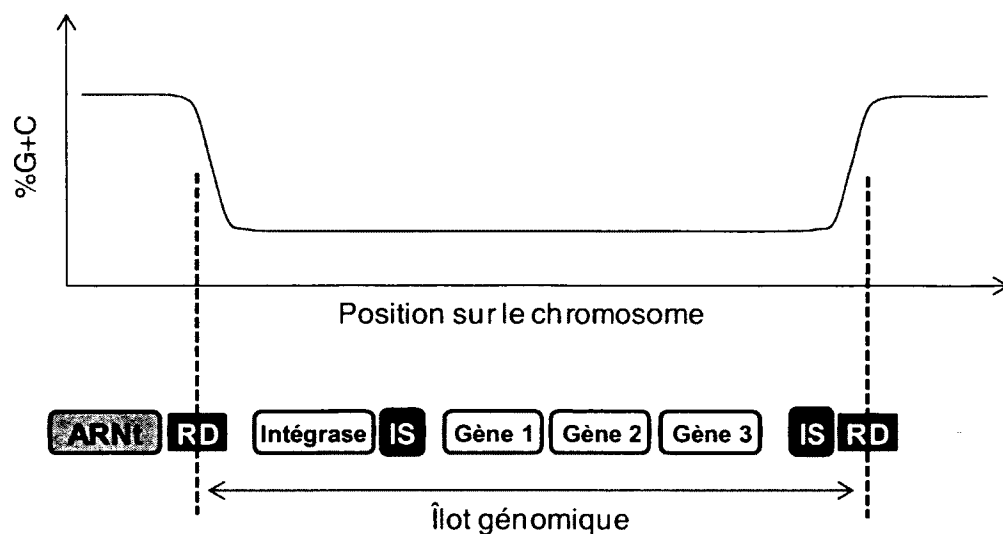


Figure 4. Caractéristiques générales d'un îlot génomique. RD : répétitions directes ; IS : séquence d'insertion. Adapté de (Juhas *et al.*, 2009)

1.2.3. Fonctions

1.2.3.1. Îlot de pathogénicité

Comme leur nom l'indique, les îlots de pathogénicité apportent un avantage à la bactérie hôte en matière de virulence, c'est à dire qu'ils augmentent le pouvoir pathogène de la bactérie lorsqu'ils sont présents. De nombreux îlots de pathogénicité sont impliqués dans la virulence des espèces de *Vibrio* pathogènes. Chez *V. cholerae*, les deux facteurs de virulence majeurs se retrouvent sur de tels îlots : la toxine cholérique est codée par le génome du phage CTX ϕ tandis que les gènes codant pour le pilus se trouvent sur l'îlot de pathogénicité VPI (*Vibrio* Pathogenicity Island). Par ailleurs la 7^{ème} pandémie de choléra est caractérisée par la présence de deux îlots de pathogénicité : VSP-1 et VSP-2 (*Vibrio* Seventh Pandemic island-1 ou -2) (Faruque et Mekalanos, 2003).

1.2.3.2. Îlot de symbiose

Lorsqu'un îlot génomique permet à la bactérie hôte de s'établir en symbiose avec un autre organisme on le nomme îlot de symbiose. C'est le cas de l'îlot de symbiose retrouvé chez *Mesorhizobium loti* R7A. Cet îlot de 502 kpb permet la symbiose de *M. loti* avec plusieurs espèces de *Lotus*, dont *Lotus corniculatus* et *L. japonicus* (Sullivan *et al.*, 2002).

1.2.3.3. Îlot de métabolisme

Un îlot de métabolisme permet à son hôte d'emprunter une nouvelle voie métabolique menant à la synthèse ou la dégradation d'un composé. Par exemple, chez *Salmonella*

enterica l'îlot CTnscr94 (100 kpb) permet à son hôte d'utiliser le sucrose comme source de carbone (Hochhut *et al.*, 1997).

1.2.3.4. Îlot de résistance

Un îlot de résistance confère à son hôte une ou plusieurs résistances à des antibiotiques ou à des métaux. La majorité des Éléments Intégratifs et Conjugatifs (ICE) de la famille SXT/R391 sont des îlots de résistance. Les principaux membres : SXT et R391, isolés respectivement d'une souche épidémique de *V. cholerae* et d'une souche de *Providencia rettgeri*, codent chacun pour des résistances différentes : l'élément SXT confère les résistances au sulfaméthoxazole, à la triméthoprine, au chloramphénicol et à la streptomycine, tandis que R391 confère les résistances à la kanamycine et au mercure (Coetzee *et al.*, 1972; Waldor *et al.*, 1996).

1.2.4. Mobilité des îlots génomiques

Les îlots génomiques sont présents uniquement dans certaines souches au sein d'une espèce. Outre cette première caractéristique ils présentent souvent une composition en bases G+C différente du reste du chromosome, ce qui laisse penser qu'ils ont été récemment acquis par transfert horizontal.

1.2.4.1. Notion de transfert horizontal

L'importance du transfert horizontal dans l'évolution des génomes bactériens n'est reconnue que depuis les années 1950, lorsque les résistances aux antibiotiques sont apparues et se sont disséminées mondialement et à une vitesse importante que les simples mutations ponctuelles ne pouvaient expliquer (Davies, 1996). Aujourd'hui le transfert

horizontal de gènes est reconnu comme l'un des mécanismes prépondérant dans l'évolution bactérienne (Frost *et al.*, 2005; Gogarten et Townsend, 2005; Lawrence et Hendrickson, 2005; Ochman *et al.*, 2005). Jusqu'à 16,6% d'un génome bactérien peut avoir été acquis par transfert horizontal (Ochman *et al.*, 2000).

Il existe trois mécanismes de transfert horizontal :

(1) La transformation représente l'acquisition par une bactérie d'ADN nu provenant de son environnement. L'ADN acquis peut provenir d'une espèce bactérienne très éloignée d'un point de vue phylogénétique. Certaines espèces peuvent en tout temps accepter un tel événement, tandis que d'autres ont besoin de conditions particulières (Dubnau, 1999). Par exemple, *V. cholerae* est naturellement compétent lorsqu'il croît sur une surface composée de chitine, un composé majeur de la carapace des crustacés (Meibom *et al.*, 2005).

(2) La transduction est le phénomène par lequel une bactérie acquiert de l'ADN étranger par l'intermédiaire d'un vecteur viral (prophage) qui a effectué un cycle de réplication dans une bactérie donneuse et a emporté des fragments d'ADN de celle-ci. La quantité d'ADN qui peut être transférée par ce mécanisme est limitée par la taille de la capside, mais peut tout de même approcher des 100 kpb. Ce phénomène est limité par le spectre d'hôte du prophage, car celui-ci reconnaît des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule bactérienne.

(3) La conjugaison nécessite un contact entre une cellule donneuse et une cellule réceptrice pour le transfert de matériel génétique. Ce phénomène peut avoir lieu entre bactéries d'espèces, de genres, voir de famille différentes, mais aussi entre bactéries et plantes, ou encore bactéries et levures (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987; Heinemann et Sprague, 1989). Le transfert se fait par l'intermédiaire d'un pore de conjugaison reliant les deux cellules. Le pore de conjugaison est formé par un système de sécrétion de type IV (Cascales et Christie, 2003).

1.2.4.2. Îlots génomiques transférables par eux-mêmes

Certains îlots génomiques, qu'ils soient îlots de pathogénicité, de symbiose, de résistance, ou de métabolisme, sont des éléments génétiques capables de se transférer d'une cellule à une autre. C'est le cas des prophages, qui grâce à leur cycle de vie peuvent transférer leur ADN, et des Éléments Intégratifs et Conjugatifs (ICE) capables de se transférer par conjugaison.

1.2.4.2.1. Prophages

Lorsqu'un phage tempéré est intégré au sein du génome d'une bactérie on parle alors de prophage. Son génome est répliqué avec le chromosome de la bactérie qui est alors qualifiée de lysogène. Généralement pendant cette phase l'expression de la majorité des gènes du phage est réprimée.

Certains phages tempérés confèrent un avantage à leur hôte. L'un des cas les plus connus est le bactériophage CTX ϕ chez *V. cholerae*.

1.2.4.2.2. Les ICE

Les ICE ont tout d'abord été décrits comme transposons conjugatifs ou plasmides intégratifs, car ils possèdent certaines caractéristiques de ces éléments. Les ICE sont des éléments intégratifs et conjugatifs, généralement intégrés de façon site-spécifique dans le chromosome et capables de se transférer par conjugaison (Wozniak et Waldor, 2010). Tous les ICE possèdent trois modules distincts permettant leur : (i) maintenance, (ii) dissémination et (iii) régulation (Burrus *et al.*, 2002; Burrus et Waldor, 2004b).

- (i) Contrairement aux plasmides conjugatifs, les ICE se maintiennent dans leur cellule hôte en s'intégrant au chromosome de celle-ci de manière similaire aux prophages. L'intégration est catalysée par une recombinase (généralement nommée Int, pour intégrase). Certains ICE, tel que Tn916, peuvent s'intégrer dans plusieurs sites du chromosome (Scott *et al.*, 1994) tandis que d'autres, par exemple SXT, ne s'intègrent qu'en un seul site (Hochhut *et al.* 1999).
- (ii) Les ICE se transfèrent par conjugaison, tout comme les plasmides conjugatifs. Ils contiennent les gènes codant pour une 'machinerie conjugative' (formation du pore de conjugaison et éventuellement formation d'un pilus, protéines de préparation de l'ADN). Les modules de dissémination diffèrent d'un ICE à un autre mais en règle générale les ICE sont transférés sous forme simple brin (le plus souvent grâce à un système de sécrétion de type IV).
- (iii) Les mécanismes qui régulent le transfert des ICE ne sont pas encore bien connus. Certains ICE confèrent une résistance à la tétracycline, et celle-ci induit leur transfert, permettant ainsi la dissémination de la résistance à la tétracycline (Salyers *et al.*, 1995b). Chez d'autres ICE le transfert est induit par la réponse SOS suite à des dommages à l'ADN (Auchtung *et al.*, 2005; Beaber *et al.*, 2004).

Le modèle de transfert de la majorité des ICE est représenté dans la Fig. 5. L'ICE s'excise pour former une molécule circulaire double brin tandis que le pore de conjugaison est synthétisé. La relaxase catalyse la coupure d'un des deux brins qui est transféré vers la cellule réceptrice. Chaque cellule possède donc après le transfert une molécule circulaire simple brin, qui sera ensuite répliquée et qui s'intégrera à nouveau au chromosome.

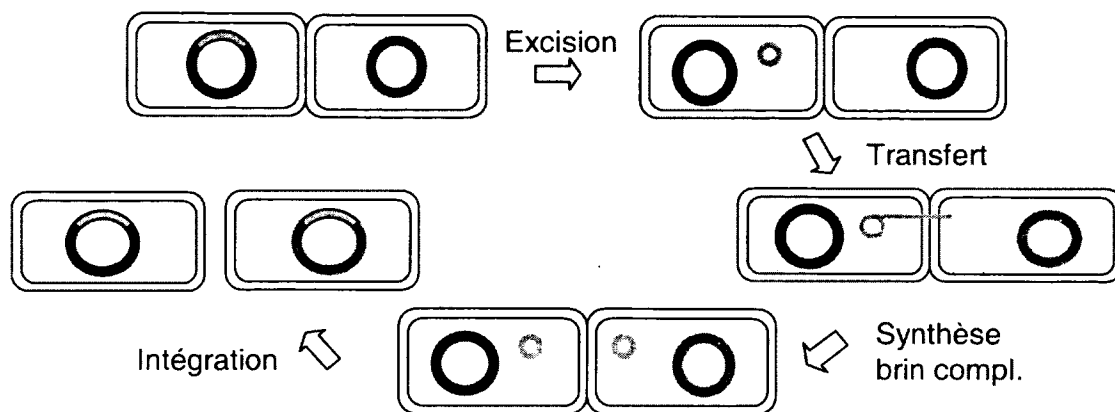


Figure 5. Mécanisme de transfert d'un ICE. L'ADN de la bactérie donneuse apparaît en rouge, celui de la bactérie réceptrice en bleu et l'ICE en vert.

Les ICE sont retrouvés dans une grande diversité de phyla bactériens et codent pour des fonctions variées, telles que des résistances aux antibiotiques, des facteurs de virulence, de nouvelles voies métaboliques, etc. (Tableau 2.).

Tableau 2. Exemple de la diversité et de la prévalence des ICE chez les eubactéries.
Adapté de (Burris et Waldor, 2004b)

Élément	Genre ou espèces	Taille (kb)	Fonctions	Intégrase	Sites d'intégration dans l'hôte d'origine
Groupe CFB					
Tc ^r ERL	<i>Bacteroides fragilis</i>	80	Tc ^r	ND	Quelques sites
C ^r TnDOT	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	65	Tc ^r Em ^r	Tyr	Quelques sites (GTTNNTTGG)
α-proteobacteria					
Symbiosis island	<i>Mesorhizobium loti</i> R7A	502	Symbiose – System sécrétion type IV	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant ARN ^t ^{Phe}
Symbiosis island	<i>M. loti</i> MAFF303099	611	Symbiose – System sécrétion type IV	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant ARN ^t ^{Phe}
β-proteobacteria					
Tn4371	<i>Ralstonia</i> sp. A5	55	Dégradation biphényle	Tyr	Quelques sites (TTTTTCAT)
γ-proteobacteria					
SXT	<i>Vibrio cholerae</i>	99.5	Su ^r Tm ^r Cm ^r Sm ^r	Tyr	Extrémité 5' de <i>prfC</i>
R391	<i>Providencia rettgeri</i>	89	Kn ^r Hg ^r	Tyr	Extrémité 5' de <i>prfC</i>
<i>clc</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. B13	105	Dégradation chlorocatechol	Tyr	Extrémité 3' de deux gène codant ARN ^t ^{Gly}
CTnscr94	<i>Salmonella enterica</i>	100	Utilisation sucrose	Tyr	Extrémité 3' de deux gène codant ARN ^t ^{Phe}
LpPI-1	<i>Legionella pneumophila</i>	65	Gènes de virulence putatifs	Tyr	A l'intérieur ou proche d'un gène codant pour ARN ^t ^{Phe}
SPI-7	<i>Salmonella enterica</i> Typhi	134	Antigène Vi (capsule)	Tyr	Extrémité 3' de deux gène codant ARN ^t ^{Phe}
ICEKp1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	76	HPI – Synthèse yersiniabactine	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant ARN ^t ^{Asn}
ICEHin1056	<i>Haemophilus influenzae</i>	59.4	Tc ^r Ap ^r	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant ARN ^t ^{Leu}
Haut G+C Gram (+)					
pSAM2	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	10.9	Non identifié	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant ARN ^t ^{Pro}
Bas G+C Gram (-)					
Tn916	<i>Enterococcus faecalis</i>	18	Tc ^r	Tyr	A+T rich
Tn5397	<i>Clostridium difficile</i>	21	Tc ^r	Ser	Single site
Tn5252	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	47	Cm ^r UV ^r	Tyr	Single intergenic site
ICESt1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	34.7	Système restriction-modification type II <i>Sti</i> 368I	Tyr	3' end of a gene encoding an aldolase
ICEBs1	<i>Bacillus subtilis</i> 168	20.5	Non identifié	Tyr	3' end of a gene encoding a ^t ^{Leu} RNA

Ap : ampicilline, Cm : chloramphénicol, Em : érythromycine, Sm : streptomycine, Su : sulfaméthoxazole, Tc : tétracycline, Tm : triméthoprime

1.2.4.3. Îlots génomiques non transférables par eux-mêmes

1.2.4.3.1. Généralités

Dans certaines revues, les phages et les ICE ne sont pas considérés comme des îlots génomiques, seuls les îlots génomiques dont on ne connaît pas le mécanisme de transfert sont considérés comme tels (Dobrindt *et al.*, 2004; Hacker et Carniel, 2001). La plupart des îlots génomiques (définition sens large) sont dans cette catégorie regroupant des éléments qui généralement semblent avoir eu des fonctions de mobilité dans le passé. Souvent ces éléments codent pour une intégrase et/ou une transposase et sont flanqués de séquences répétées. Ces îlots génomiques semblent être d'anciens éléments génétiques mobiles qui se sont insérés dans le chromosome puis ont évolué, notamment par délétion, et ont perdu leur caractère mobile (Fig. 6.).

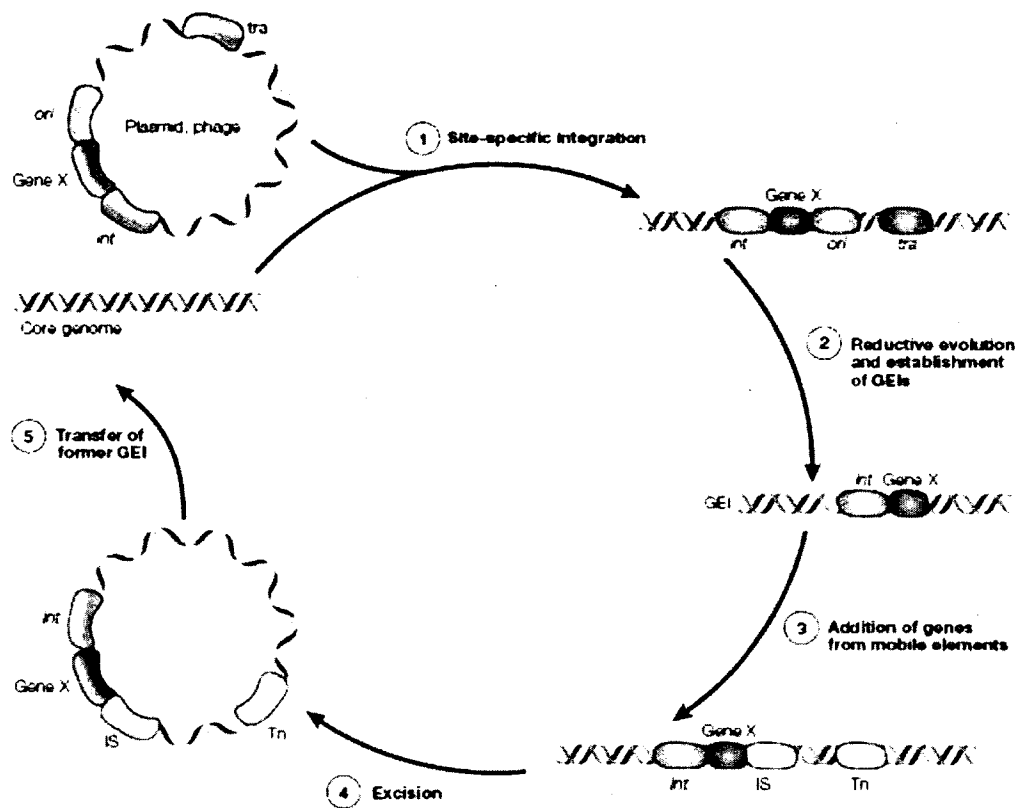


Figure 6. Hypothèse sur l'origine des îlots génomiques. Reproduit avec permission (Dobrindt *et al.*, 2004).

Si l'îlot génomique possède une intégrase fonctionnelle, il peut s'exciser de façon site-spécifique. Ce phénomène a été démontré pour un grand nombre d'entre eux (Blum *et al.*, 1994; Hochhut *et al.*, 2006; Middendorf *et al.*, 2004; Murphy et Boyd, 2008; Rajanna *et al.*, 2003; Swenson *et al.*, 1996). Une fois excisé il est possible qu'un îlot génomique soit mobilisé. Pour quelques îlots génomiques seulement le mécanisme de mobilisation a été élucidé.

1.2.4.3.2. Les HPI chez *Yersinia* sp.

L'îlot génomique HPI pour « Hight Pathogenicity Island », découvert dans les espèces *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* code pour un système d'acquisition du fer, la yersiniabactine (Carniel, 2001). Cet îlot de pathogénicité est reconnu comme facteur de virulence essentiel pour ces espèces. On retrouve également l'îlot HPI ou des dérivés de celui-ci dans d'autres genres de la famille des Enterobacteriaceae, tels que *E. coli*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella*, *Serratia liquefaciens* et *Salmonella enterica* (Bach *et al.*, 2000; Olsson *et al.*, 2003; Petermann *et al.*, 2008). En 2004, Schubert a rapporté l'existence chez *E. coli* ECOR31 d'un HPI homologue. Cet HPI, qui comporte une séquence additionnelle de 35 kpb est un ICE (ICE*Ec*1) et pourrait représenter le progéniteur putatif des autres HPI (Schubert *et al.*, 2004a). Les 35 kpb supplémentaires de ICE*Ec*1 possèdent les gènes de mobilité manquant aux HPI. Les HPI ont toutefois gardé la capacité de s'exciser et s'intégrer de façon site-spécifique dans le gène codant pour l'ARNt *asn* (asparagine) (Fig. 7.).

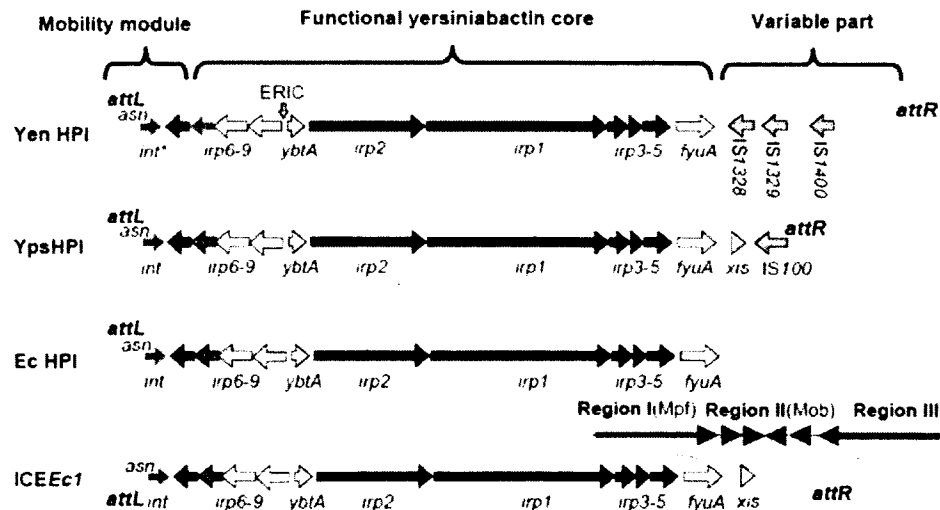


Figure 7. Structure et organisation des HPI de *Y. enterocolitica* WA-314 (HPI_{Yen}), *Y. pestis* (HPI_{Yps}), *E. coli* (HPI_{Ec}) et *E. coli* ECOR31 (HPI_{Ec}/ICE*Ec*1). Reproduit avec permission (Schubert *et al.*, 2004b).

Le transfert horizontal de l'îlot HPI chez *Y. pseudotuberculosis* a déjà été rapporté (Lesic et Carniel, 2005; Lesic *et al.*, 2012); cependant, il s'agissait dans ce cas d'un transfert non spécifique du HPI lors de transfert de larges régions d'ADN chromosomique incluant HPI. Ce transfert ne requiert pas les capacités d'intégration et d'excision site spécifique du HPI et nécessite au contraire l'implication de RecA.

Par ailleurs, des plasmides possédant ce gène *asn* ont été décrits dans la littérature (Parkhill *et al.*, 2001) et pourraient par conséquent servir de vecteur pour la dissémination des HPI (Schubert *et al.*, 2004b). De plus, les HPI et ICEEc1 possédant le même site d'attachement il est possible que l'ICEEc1 s'intègre en tandem avec un HPI, les deux éléments pourraient ensuite s'exciser en formant un co-intégrat puis se transférer par conjugaison. Cette hypothèse de mobilisation d'un îlot génomique par un ICE ne concerne pas seulement les HPI et a été mise en avant en 2004 (Burrus et Waldor, 2004b).

1.2.4.3.3. Les SaPI chez *Staphylococcus aureus*

Les îlots de pathogénicité de *Staphylococcus aureus* (SaPI pour *S. aureus* Pathogenicity Island) sont de petits îlots génomiques de 14 à 16 kpb ayant une relation étroite avec certains phages tempérés avec lesquels ils partagent plusieurs fonctions essentielles : une intégrase (Maiques *et al.*, 2007; Ruzin *et al.*, 2001; Ubeda *et al.*, 2003), un réplicon (Ubeda *et al.*, 2007), et un module d'emballage. Les protéines phagiques qui manquent aux SaPI sont les protéines structurales formant la capsid virale. En 2008, une étude a démontré l'emballage de SaPIbov1 et SaPII dans des capsides composées de protéines virales des phages $\phi 11$ et 80 α (Tormó *et al.*, 2008) (Fig. 8.).

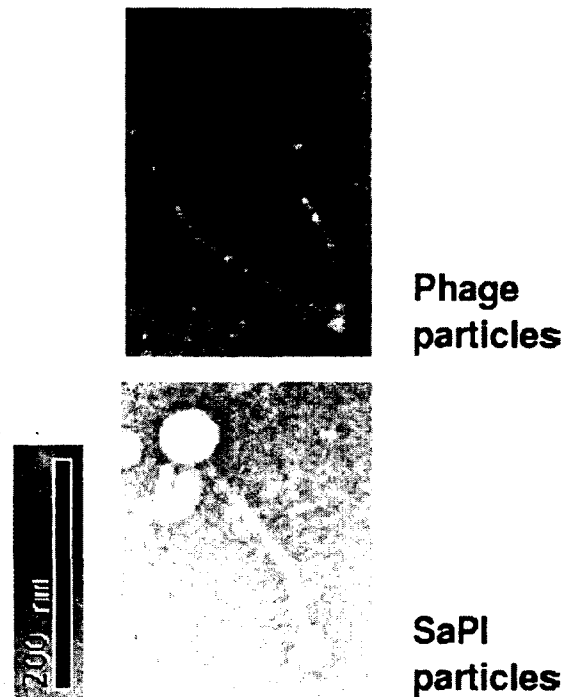


Figure 8. Observation de particules phagiques et de particules contenant la séquence de SaPI_{bov1} par microscopie électronique. Adapté de (Tormo *et al.*, 2008)

Plus récemment la présence d'une excisionase (Xis) a été mise en évidence chez SaPI_{bov1} et SaPI₁₁. Elle est codée par les îlots eux-mêmes et participe avec l'intégrase des SaPI à leur excision du chromosome (Mir-Sanchis *et al.*, 2012). L'excision et la réplication des SaPI sont induites par les phages qui les mobilisent (Lindsay *et al.*, 1998; Tormo-Mas *et al.*, 2010). La plupart des SaPI sont des îlots de pathogénicité : ils codent pour un ou plusieurs superantigènes et des facteurs de virulence et sont la première cause des pathologies induites par des superantigènes (Novick *et al.*, 2010; Viana *et al.*, 2010).

1.2.4.3.4. Les NBU chez *Bacteroides* sp.

Les NBU (Nonreplicating Bacteroides Units) sont des îlots génomiques de 10 à 12 kpb intégrés au chromosome et qui peuvent s'exciser et être mobilisés par les ICE de *Bacteroides* Tc^rERL et CTnDOT (Salyers *et al.*, 1995a). Ces ICE confèrent une résistance à la tétracycline et sont induits par celle-ci. Les NBU présentent une intégrase fonctionnelle, une protéine de mobilisation apparentée à une relaxase (Li *et al.*, 1995) ainsi qu'une origine de transfert (*oriT*). Le rôle de la relaxase est de catalyser la coupure, au niveau de l'*oriT*, d'un des deux brins de l'élément excisé afin de permettre son transfert dans la cellule réceptrice (Li *et al.*, 1993).

Le mécanisme exact de la mobilisation des NBU par les ICE n'est pas connu, la tétracycline induit l'expression du gène *rteB* de l'ICE qui va induire l'excision des NBU (Fig. 9.) ainsi que l'expression des protéines de transfert de l'ICE. Une fois les NBU excisés il est probable qu'ils empruntent le pore conjugatif synthétisé par l'ICE puisque aucun gène de formation de pore de conjugaison n'a été décrit dans le génome des NBU.

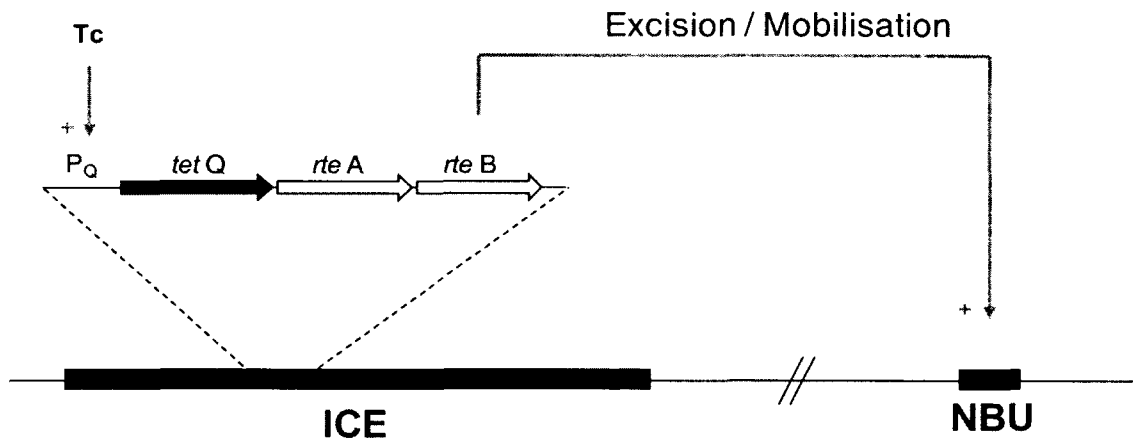


Figure 9. Modèle de l'induction de l'excision et de la mobilisation des NBU par les ICE sous induction à la tétracycline.

Trois NBU ont été décrits, et ne semblent pas conférer de résistance aux antibiotiques, mais un élément apparenté, nommé Tn4555, confère une résistance à la cefoxitine (Smith et Parker, 1993). Cet élément pourrait être mobilisé par les ICE de *Bacteroides* de la même façon que les NBU.

1.2.4.3.5. L'îlot SGI1 chez *Salmonella*

L'îlot SGI1 (Salmonella Genomic Island 1) a été décrit pour la première fois dans la souche épidémique multirésistante *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT104 (*S. Typhimurium* DT104) (Boyd *et al.*, 2001; Boyd *et al.*, 2000). Depuis sa découverte, il a été décrit dans d'autres sérovars (*S. Agona*, *S. paratyphi* B, *S. Albani*, *S. meleagridis* et *S. Newport*) (Boyd *et al.*, 2001; Boyd *et al.*, 2000; Cloeckaert *et al.*, 2000; Doublet *et al.*, 2003; Doublet *et al.*, 2004; Ebner *et al.*, 2004; Meunier *et al.*, 2002; Mulvey *et al.*, 2004). Cet îlot de 43 kpb contient un intégron de classe I qui regroupe des gènes conférant les résistances à l'ampicilline, au chloramphénicol, au florfenicol, à la streptomycine, à la spectinomycine, aux sulphonamides et à la tétracycline (Boyd *et al.*, 2002).

SGI1 est incapable de se transférer par lui-même, mais il est capable de s'exciser et de s'intégrer de façon site-spécifique dans l'extrémité 3' du gène *thdF*. SGI1 possède toutefois plusieurs gènes codant pour des protéines ayant une certaine homologie avec des protéines de conjugaison du plasmide R27 de *S. Typhi* (Sherburne *et al.*, 2000). Une étude a démontré qu'il pouvait être mobilisé avec l'aide du plasmide conjugatif R55 de *Klebsiella pneumoniae* (Gaffney *et al.*, 1981) et suggère qu'il manque certaines protéines de mobilisation à SGI1 pour lui permettre de se transférer par lui-même (Doublet *et al.*, 2005). En s'appuyant sur ses caractères intégratif et mobilisable, Doublet propose de classer SGI1 dans une nouvelle catégorie : les éléments intégratifs mobilisables (IME pour « *Integrative Mobilizable Elements* »). Une étude plus récente a démontré que la mobilisation de SGI1

est plus généralement effectuée par les plasmides du groupe d'incompatibilité IncA/C, dont R55 fait partie (Douard *et al.*, 2010).

1.2.4.3.6. Les CIME chez *Streptococcus thermophilus*

Plusieurs îlots génomiques identifiés chez *Streptococcus thermophilus* partagent le même site d'intégration au sein du chromosome que l'ICE ICES_{St1} (le gène *fda*). À l'inverse des HPI, ces îlots génomiques ne semblent pas apparentés aux ICE qui partagent leur site d'intégration et n'ont pas la capacité de s'exciser par eux-mêmes. Par contre, lorsqu'ils sont intégrés en tandem avec un ICE de *Streptococcus*, ils peuvent être co-excisés avec l'ICE puis mobilisés en *cis* grâce à ce dernier (Bellanger *et al.*, 2011). Ces éléments ont été nommés CIME pour Éléments Mobilisables en CIs (« *CIs Mobilizable Elements* »).

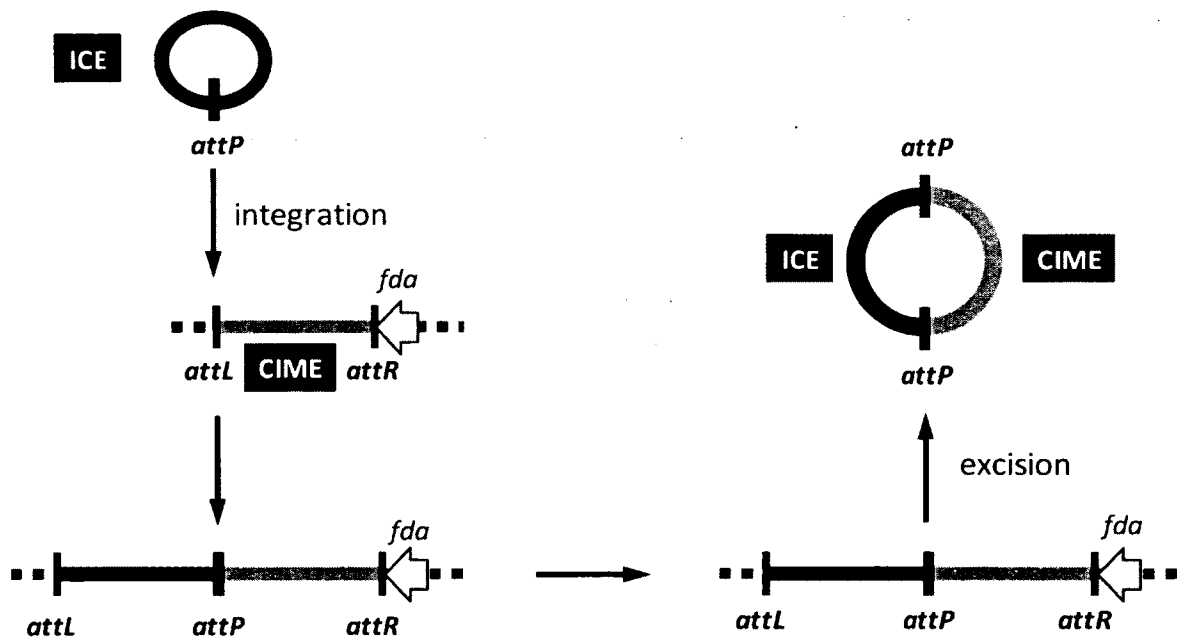


Figure 10. Modèle de la mobilisation d'un CIME par un ICE.

1.3. Les ICE de la famille SXT/R391

1.3.1. Définition / Structure

Les ICE de la famille SXT/R391 regroupent tous les ICE possédant une intégrase apparentée à Int_{SXT} et qui s'intègrent dans le gène *prfC* au niveau du chromosome de leur hôte (Burrus *et al.*, 2006). Les deux membres représentatifs de la famille, SXT et R391, ont été respectivement isolés de la souche épidémique de *V. cholerae* O139 (Inde, 1992) (Waldor *et al.*, 1996) et d'une souche clinique de *Providencia rettgeri* (Afrique du Sud, 1967) (Coetzee *et al.*, 1972).

Tous les membres de cette famille partagent un large squelette de gènes communs (Fig. 11.), présentant les trois modules décrits précédemment (maintien, dissémination, régulation).

Chaque élément présente, à l'intérieur de ce squelette, différentes insertions qui lui sont propres ou sont partagées par plusieurs éléments de la famille (Fig. 11). C'est à l'intérieur de ces régions variables que l'on trouve des gènes codant pour des fonctions plus spécifiques telles que des résistances aux antibiotiques ou aux métaux, ou encore des protéines impliquées dans des voies de signalisation (Bordeleau *et al.*, 2010).

Les ICE de la famille SXT/R391 ont une structure mosaïque qui reflète leur probable évolution par recombinaison (Wozniak *et al.*, 2009). Cette théorie est également appuyée par la découverte de la possibilité des ICE de cette famille de former des tandems au sein de leur site d'intégration puis de recombiner grâce à un système de recombinaison apparenté au système Red du phage λ qu'ils codent, leur permettant de générer de nouveaux ICE hybrides (Burrus et Waldor, 2004a; Garriss *et al.*, 2009; Hochhut *et al.*, 2001).

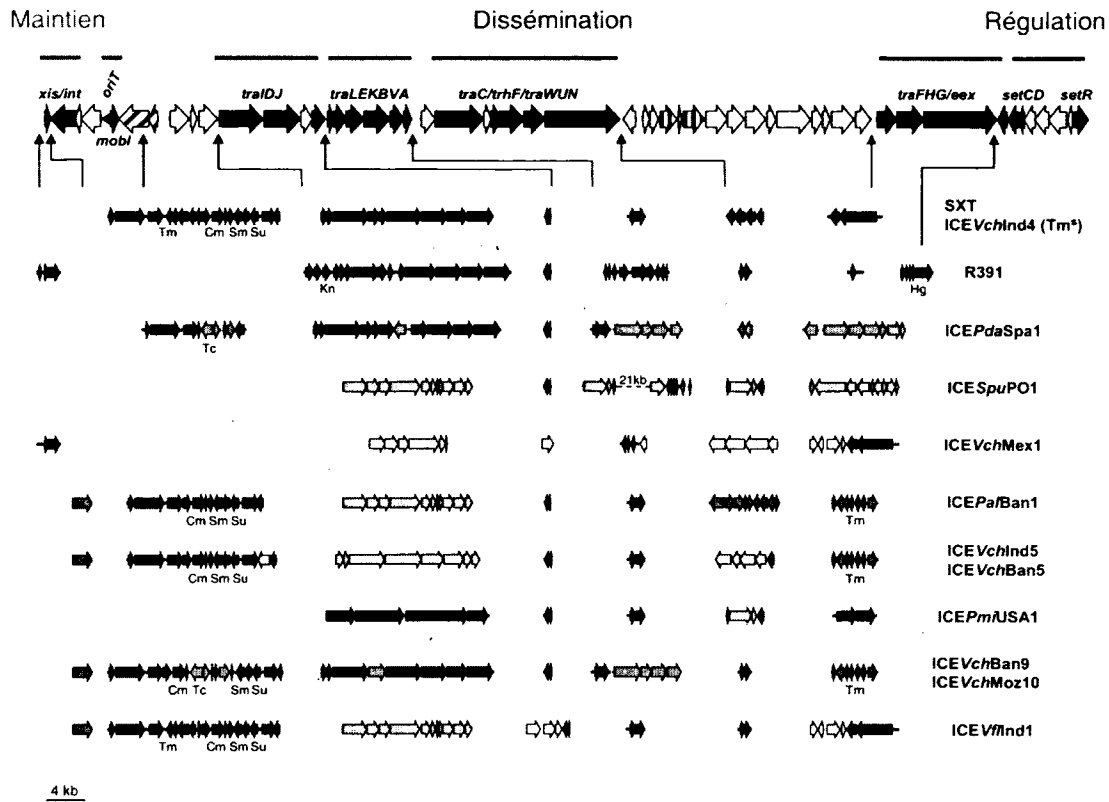


Figure 11. Représentation du squelette commun des ICE de la famille SXT/R391 et des régions variables d'un échantillon de différents ICE de cette famille. Adapté de (Wozniak *et al.*, 2009).

1.3.2. Distribution

Les ICE de la famille SXT/R391 se retrouvent à l'échelle mondiale aussi bien dans des souches environnementales que dans des isolats cliniques ou des espèces pathogènes pour le poisson. Ces espèces appartiennent principalement au genre *Vibrio* mais aussi aux genres *Providencia*, *Shewanella* et *Photobacterium* (Fig. 12.).

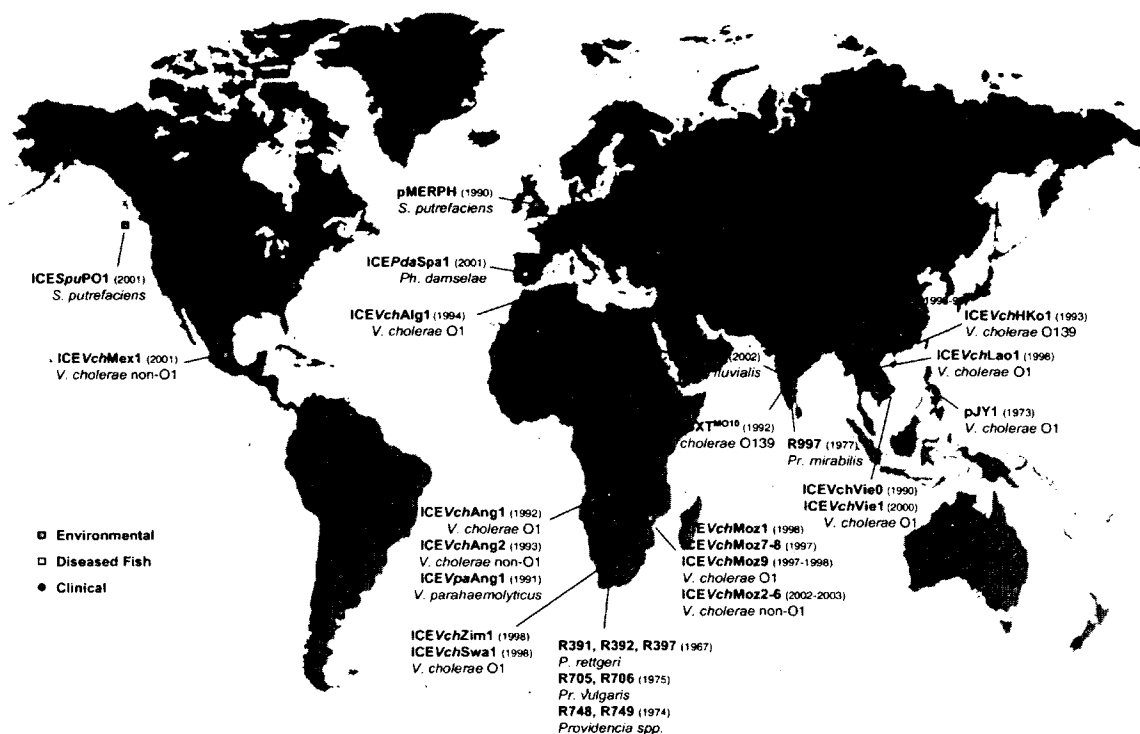


Figure 12. Distribution mondiale des ICE de la famille SXT/R391. Reproduit avec permission (Burrus *et al.*, 2006).

La détection d'ICE de la famille SXT/R391 dans des vibrios d'Asie, d'Afrique, d'Europe et d'Amérique reflète une probable ancienneté de la relation entre ce groupe d'ICE et les vibrios. Les vibrios ne sont pourtant peut-être pas les premiers hôtes des ICE SXT/R391 puisque certains ont été découverts dans d'autres gammaprotéobactéries, telles que *Providencia rettgeri*, *Shewanella putrefaciens* et *Photobacterium damsela* (Coetzee *et al.*, 1972; Osorio *et al.*, 2008; Pembroke et Piterina, 2006). Cette famille d'ICE est la plus étudiée et compte aujourd'hui plus de 35 éléments.

1.3.3. Mécanisme de transfert de SXT

Trois étapes sont importantes dans le transfert de SXT : (i) excision du chromosome et formation d'un intermédiaire circulaire, (ii) transfert conjugatif vers une nouvelle cellule, et (iii) intégration de la molécule transférée dans le chromosome du nouvel hôte.

1.3.3.1. Excision et intégration

SXT est flanqué de séquences répétées de 17 pb (*attL* et *attR*), qui permettent à l'élément de s'exciser et s'intégrer au chromosome de façon site-spécifique. Une recombinaison site spécifique catalysée par l'intégrase entraîne l'excision de l'ICE et la formation d'un site *attP* sur l'élément excisé et *attB* au niveau du chromosome (Fig. 13.). Le site *attB* de SXT représente son site d'intégration au sein du chromosome et est localisé proche de l'extrémité 5' du gène *prfC*, dont le produit est impliqué dans la régulation de la traduction (Hochhut et Waldor, 1999). L'intégration de SXT interrompt le début du gène *prfC* ; cependant, il fournit une nouvelle séquence codante et un promoteur qui permettent l'expression d'une protéine fonctionnelle.

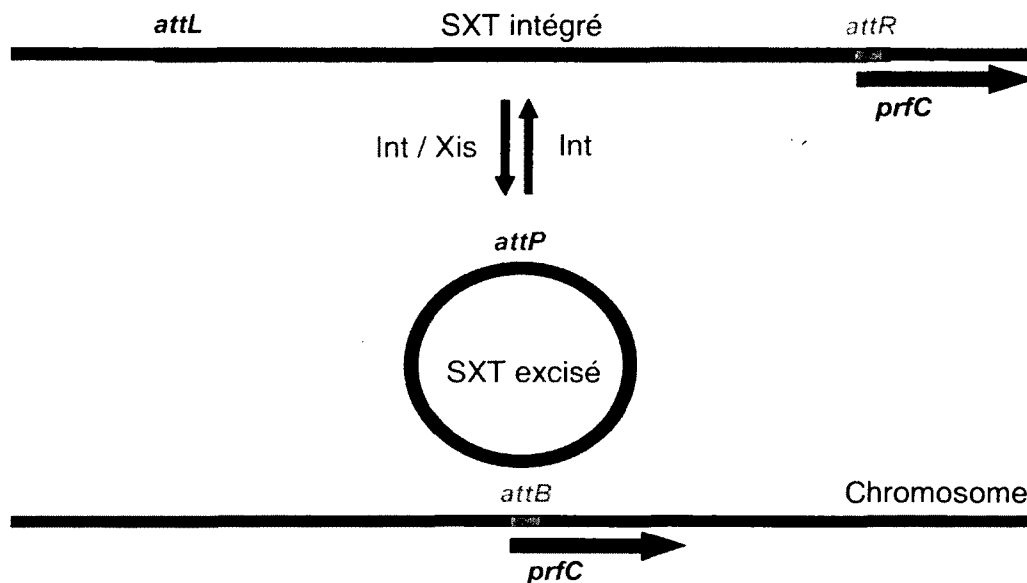


Figure 13. Excision de SXT par recombinaison site-spécifique entre les séquences *attL* et *attR*.

L'excision de SXT requiert la recombinase Int, qui appartient à la famille des recombinases à tyrosine site-spécifiques, et est facilitée par une excisionase, Xis (Burrus et Waldor, 2003). Xis est un facteur d'orientation de la recombinaison (RDF pour « *Recombination Directionality Factor* »). La recombinaison entre les sites *attP* et *attB* entraîne l'intégration site-spécifique de l'ICE au sein de son site d'intégration dans le chromosome. Contrairement à l'excision, l'intégration de SXT dans le chromosome requiert seulement Int.

Int et Xis étant situées sur le squelette de gènes communs des ICE SXT/R391, les mécanismes d'excision et d'intégration de tous les ICE de cette famille doivent ressembler au mécanisme décrit ci-dessus (Burrus et Waldor, 2003).

1.3.3.2. Transfert conjugatif

Par analogie avec le plasmide conjugatif F et parce que SXT encode une protéine TraI (relaxase), SXT est très certainement transféré sous forme simple brin dans la cellule réceptrice. Les gènes nécessaires au transfert de SXT ont été identifiés par analyse de séquence. Les protéines codées par ces gènes (*tra*) ont une homologie significative avec les protéines Tra des plasmides conjugatifs pCAR1, isolé de *Pseudomonas resinovorans* (Maeda *et al.*, 2003), Rts1, isolé de *Proteus vulgaris* (Murata *et al.*, 2002), mais surtout avec les plasmides conjugatifs du groupe d'incompatibilité IncA/C (Fricke *et al.*, 2009), tel que pIP1202 de *Yersinia pestis* (Welch *et al.*, 2007). Au delà de l'homologie l'organisation des gènes est similaire, ce qui laisse penser à une origine commune de ces éléments conjugatifs (Burrus *et al.*, 2006; Wozniak *et al.*, 2009).

Les gènes responsables du transfert de SXT sont regroupés en cinq régions distinctes (module dissémination dans Fig. 11.). Dans les deux premières régions on trouve les gènes et les séquences nécessaires à l'initiation du transfert et à la préparation de l'ADN. On y retrouve notamment l'origine de transfert (*oriT*) et les gènes codant pour les protéines de mobilisation MobI et TraI. MobI serait impliquée dans la reconnaissance de l'*oriT* tandis que TraI, la relaxase, catalyse la coupure d'un des deux brins de l'ICE au niveau de l'*oriT* (Ceccarelli *et al.*, 2008). La formation du pore conjugatif et du pilus requiert les trois autres régions (Beaber *et al.*, 2002).

Tous les gènes de transfert identifiés font partie du squelette commun des ICE de la famille SXT/R391, le mécanisme de conjugaison est donc fort probablement identique d'un élément à l'autre.

1.3.4. Régulation et maintenance

La régulation du transfert des ICE SXT/R391 se fait de façon similaire à la régulation du cycle lytique du phage λ . SetR, est un répresseur ayant une homologie significative avec le répresseur *ci* du phage λ et semble tout en haut de la cascade de régulation du transfert des ICE SXT/R391. SetR inhibe l'expression d'un opéron contenant les deux activateurs clefs du transfert : *setC* et *setD* (Beaber *et al.*, 2002). SetC et SetD activent l'expression de *int*, *xis* ainsi que des quatre opérons *tra*. En présence de dommages à l'ADN, la réponse SOS de la cellule est enclenchée et induit l'auto protéolyse de SetR. La répression de SetC et SetD est levée, par conséquent le transfert est activé (Beaber *et al.*, 2004) (Fig. 14.).

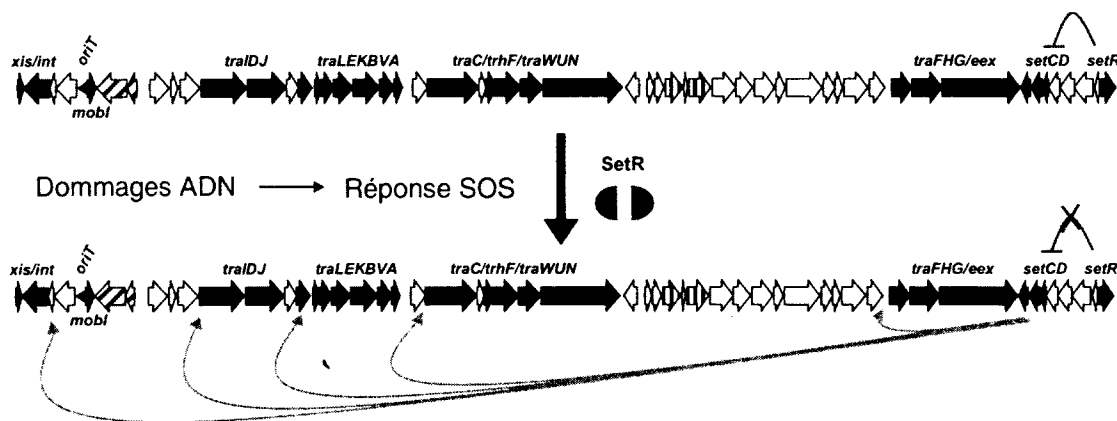


Figure 14. Régulation du transfert des ICE de la famille SXT/R391. (Beaber *et al.*, 2002; Burrus *et al.*, 2006).

Lorsqu'un ICE est présent dans une population de cellules, un équilibre se fait entre la forme excisée et la forme intégrée de l'élément. Si on considère une population de *E. coli* contenant SXT, environ 2% de la population contient SXT sous sa forme excisée (Burrus et Waldor, 2003). Cette excision représente un danger pour la stabilité de l'élément en cas de division de la cellule puisque celui-ci ne se réplique pas de façon autonome. Pour remédier à ce problème, une étude a récemment démontré que l'ICE SXT code pour son propre

système toxine/antitoxine, nommé *mosT/mosA* (Wozniak et Waldor, 2009). Ce système n'est pas situé sur le squelette commun, il n'est présent que chez certains ICE de la famille SXT/R391. R391 ne possède pas le système *mosT/mosA* mais sa stabilité est semblable à SXT, ce qui suggère que R391 possède peut-être un autre système de maintenance.

1.3.5. Rôle dans la plasticité génomique

La famille SXT/R391 joue un rôle certain dans la plasticité génomique des gammaprotéobactéries, et plus particulièrement des *Vibrio*, au niveau du locus *prfC*.

Les ICE SXT/R391 possèdent dans leur squelette de gènes communs un système de recombinaison qui leur permet, lorsque deux ICE sont intégrés en tandem dans une cellule, de recombiner et de former un ICE hybride (Burrus et Waldor, 2004a; Garriss *et al.*, 2009). Ce mécanisme leur permet non seulement de promouvoir leur propre diversité génétique mais aussi d'influencer celle des hôtes bactériens concernés.

Le rôle des ICE SXT/R391 est d'autant plus important dans la plasticité génomique qu'ils peuvent mobiliser certains plasmides et de larges fragments d'ADN chromosomique en 3' de leur site d'intégration (Hochhut *et al.*, 2000).

1.4. Hypothèse générale du projet de doctorat

Lors d'un stage précédant le début de mon doctorat et effectué au laboratoire, j'ai participé à un projet qui visait à déterminer la localisation de l'origine de transfert (*oriT*) des ICE SXT/R391 (Ceccarelli *et al.*, 2008). Une fois la séquence déterminée, nous avons découvert la présence d'une séquence similaire (63,4% d'identité) dans trois souches distinctes : *V. cholerae* RC385 (souche environnementale isolée dans la baie de Chesapeake, aux Etats-Unis), *V. vulnificus* YJ016 (souche clinique provenant de Taiwan) et *Alteromonas macleodii* 'Deep Ecotype' (souche environnementale provenant de la mer méditerranée). En analysant les séquences entourant l'*oriT* dans ces souches nous avons identifié non pas des ICE de la famille SXT/R391 mais trois îlots génomiques partageant plusieurs caractéristiques ; soit : (i) le même site d'intégration au niveau du chromosome de leur hôte (à l'extrémité 3' d'un gène homologue au gène *yicC* chez *E. coli* et codant pour une protéine putative induite en cas de stress), (ii) des répétitions flanquant les îlots (*attL* et *attR*), et (iii) un gène codant une intégrase ainsi que trois autres gènes conservés.

Cette nouvelle famille d'îlots génomiques semblait posséder les caractéristiques requises pour leur excision (intégrase et sites *attL/attR*), cependant aucun gène codant pour des protéines apparentées à des protéines de transfert (protéines *tra* chez SXT) n'avait pu être identifié. Ces observations, combinées à la présence sur ces îlots d'une séquence similaire à l'*oriT* des ICE de la famille SXT/R391, nous ont suggéré l'hypothèse de mon projet de recherche : ces îlots génomiques peuvent s'exciser et utiliser la machinerie conjugative des ICE de la famille SXT/R391 pour être transférés dans une cellule réceptrice. Nous avons nommés ces éléments MGI, pour îlots génomiques mobilisables (« *Mobilizable Genomic Islands* »).

Pour vérifier l'hypothèse générale de ce projet, plusieurs objectifs ont été définis :

- o Étudier le mécanisme de mobilisation des MGI par les ICE SXT/R391
 - Intégration/Excision
 - Mobilisation
- o Caractériser les MGI
 - Identification de nouveaux MGI
 - Fonctions des MGI
- o Montrer la mobilisation du chromosome par les MGI
- o Étudier l'impact des MGI sur la plasticité des génomes et la virulence des vibrios

L'étude du mécanisme de transfert des MGI et de la mobilisation d'ADN chromosomique grâce aux MGI a mené à la publication d'un premier article, présenté dans la partie 2.1. Une étude plus poussée des mécanismes d'intégration et d'excision des MGI, ainsi que la régulation de ces phénomènes a fait l'objet d'une deuxième publication, présentée dans la partie 2.2. Enfin, la découverte de nouveaux MGI dans des souches non séquencées ont mené à la mise au point d'un système de capture afin de capturer et séquencer ces éléments. Parallèlement, le séquençage massif de génomes bactériens dans les dernières années a permis l'identification d'autres MGI et la réalisation d'une étude phylogénétique sur cette famille d'éléments mobilisables. Ces derniers résultats ont fait l'objet d'un troisième article, présenté dans la partie 2.3.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.1. Les ICE de la famille SXT/R391 induisent l'excision et mobilisent une nouvelle classe d'ilots génomiques chez *Vibrio*

Les résultats présentés dans cette partie visaient à présenter les MGI et démontrer leur mécanisme inédit de mobilisation. Plusieurs expériences impliquant des délétions, des complémentations sur un ICE et un MGI ainsi que leur impact sur la mobilisation des MGI ont été effectuées. Ces résultats ont permis de mettre en évidence le mécanisme de mobilisation des MGI par les ICE de la famille SXT/R391. Ainsi, il a été démontré que la mobilisation des MGI passe effectivement par la reconnaissance de l'*oriT* similaire par les protéines du relaxosome de l'ICE. Les résultats ont également montré que l'excision et l'intégration des MGI est catalysée par l'intégrase qu'ils codent. De plus, tout comme les ICE, le transfert des MGI peut être initié à l'*oriT* sans que le MGI soit préalablement excisé. Dans ce cas, il s'est avéré que de larges portions d'ADN chromosomique peuvent être transférées. Enfin, il a été démontré que l'excision des MGI est induite par SetC et SetD, les activateurs transcriptionnels des ICE SXT/R391. Finalement, compte tenu du fait que l'excision des MGI est induite par SetC et SetD et que leur mobilisation est effectuée par les protéines de transfert des ICE SXT/R391 (codées par des gènes également sous l'influence de SetC et SetD), il a été démontré que l'excision et le transfert des MGI sont fortement induits par la réponse SOS.

Le mécanisme de transfert des MGI représente un mécanisme inédit de mobilisation, les résultats obtenus sont présentés dans l'article intitulé « *Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of Vibrio*

genomic islands » (Daccord *et al.*, 2010). Par ailleurs cette étude a fait l'objet d'un micro commentaire publié dans la même édition du journal *Molecular Microbiology* et intitulé « *Mobilizable genomic islands: going mobile with oriT mimicry* » (Waldor, 2010).

La contribution des auteurs dans l'article est la suivante : D. Ceccarelli a construit les plasmides poriT_{VchUSA1} ainsi que poriT_{VvuTai1} et a testé leur mobilisation. Elle a aussi effectué les délétions de *mobI* et *traI* dans SXT (les mutants SXT Δ *int*, SXT Δ *xis*, SXT Δ *setCD* étaient déjà disponibles au laboratoire). J'ai réalisé les délétions de *int* et *oriT* et l'insertion du gène de résistance dans MGIV Δ *Ind1*. J'ai construit le plasmide pIntVvu ainsi que l'ensemble des souches présentées dans l'étude. J'ai réalisé les expériences de transfert conjugatif, d'excision par PCR nichée et d'excision par PCR quantitative. L'ensemble du travail de recherche a été supervisé par le Pr. V. Burrus. Avec son aide, j'ai analysé l'ensemble des résultats et rédigé le manuscrit.

Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* Genomic Islands

Aurélie Daccord¹, Daniela Ceccarelli^{1,2} and Vincent Burrus¹

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

²Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma Sapienza, Rome, Italy

Abstract

In vibrios and enterobacteria lateral gene transfer is often facilitated by Integrating Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 family. SXT/R391 ICEs integrate by site-specific recombination into *prfC* and transfer by conjugation, a process that is initiated at a specific locus called the origin of transfer (*oriT_{SXT}*). We identified genomic islands (GIs) harboring a sequence that shares >63% identity with *oriT_{SXT}* in three species of *Vibrio*. Unlike SXT/R391 ICEs, these GIs are integrated into a gene coding for a putative stress-induced protein and do not appear to carry any gene coding for a conjugative machinery or for mobilization proteins. Our results show that SXT/R391 ICEs trigger the excision and mediate the conjugative transfer *in trans* of the three *Vibrio* GIs at high frequency. GIs' excision is independent of the ICE-encoded recombinase and is controlled by the ICE-encoded transcriptional activator SetCD, which is expressed during the host SOS response. Both *mobI* and *tral*, two ICE-borne genes involved in *oriT*-recognition, are essential for GIs' transfer. We also found that SXT/R391 ICEs mobilize *in trans* over 1Mb of chromosomal DNA located 5' of the GIs' integration site. Together these results support a novel mechanism of mobilization of GIs by ICEs of the SXT/R391 family.

Introduction

Reconstitution by comparative genomics of the evolution of pandemic and epidemic strains of *Vibrio cholerae*, the causative agent of cholera, offers a spectacular example of how lateral gene transfer and mobile genetic elements have shaped the genomes of microorganisms, contributing to their adaptation to a changing environment (Chun *et al.*, 2009). In bacterial genomes, the result of gene exchanges is often detected by the presence of DNA segments known as Genomic Islands (GIs). These 10- to 550-kb DNA segments identified by comparing closely related strains are usually flanked by short direct repeats, associated with tRNA genes and have a G+C content that often differs from the surrounding chromosome (Dobrindt *et al.*, 2004, Boyd *et al.*, 2009, Juhas *et al.*, 2009). GIs often harbor functional or cryptic genes encoding site-specific recombinases (integrases) and/or transposases that may be involved in their integration into the chromosome. They also carry genes that confer a fitness advantage to their bacterial host. GIs encoding virulence determinants or colonization factors that promote the pathogenicity of the bacterium or its survival into the host are referred to as pathogenicity islands (Dobrindt *et al.*, 2004). To date, identification of the mechanisms promoting GI acquisition or exchange between bacteria has remained extremely challenging (Juhas *et al.*, 2009). Recently, Boyd *et al.* (Boyd *et al.*, 2009) suggested that their transfer probably involves uptake by transformation or hitchhiking with mobile elements such as generalized transducing phages, conjugative plasmids or Integrating Conjugative Elements (ICEs).

ICEs, also known as conjugative transposons, are self-transmissible mobile genetic elements (Salyers *et al.*, 1995b, Scott *et al.*, 1995, Burrus *et al.*, 2002, Burrus *et al.*, 2004, Seth-Smith *et al.*, 2009, Wozniak *et al.*, 2010) that transfer by conjugation like conjugative plasmids. However, like temperate bacteriophages, ICEs integrate into and replicate with the bacterial chromosome. Upon specific environmental conditions, integrated ICEs can excise from the chromosome and form circular molecules that are intermediates for conjugative transfer.

The SXT/R391 family of ICEs, one of the largest and most diverse set of ICEs studied, is composed of more than 30 members found in clinical and environmental strains of several species of γ -proteobacteria isolated over the past 40 years (Burrus *et al.*, 2006). SXT/R391 ICEs have played a critical role in the emergence of multiple drug-resistant strains of *V. cholerae* in Asia and Africa in the early 90s. More recently, most clinical isolates of *V. cholerae* from these two continents carry an SXT/R391 ICE. Comparative genomic analyses of 13 SXT/R391 ICEs derived from diverse hosts and locations revealed that they share 52 perfectly syntenic and nearly identical core genes encoding all the factors needed for their own mobility and inheritance (Wozniak *et al.*, 2009). One of these genes, *int_{SXT}*, encodes a tyrosine recombinase that enables site-specific integration of SXT/R391 ICEs into the 5' end of *prfC*, a conserved chromosomal gene that encodes peptide chain release factor 3 (RF3) (Hochhut *et al.*, 1999). The integrase *Int_{SXT}* mediates recombination between nearly identical 17-bp sequences on the circular form of the element (*attP*) and at the chromosomal site (*attB*). Aided by the recombination directionality factor Xis, *Int_{SXT}* also mediates ICE excision from the host chromosome by recombining the flanking *attL* and *attR* sites to regenerate *attP* and *attB* (Hochhut *et al.*, 1999, Burrus *et al.*, 2003). Conjugative transfer of SXT/R391 ICEs is initiated at a *cis*-acting conserved 299-bp locus called the origin of transfer (*oriT_{SXT}*) located in the intergenic region between *s003* and *mobI* (Ceccarelli *et al.*, 2008). By analogy with conjugative plasmid F, *oriT_{SXT}* would be nicked by the putative relaxase TraI, forming a single-strand DNA break (Grandoso *et al.*, 2000). Translocation of the single-stranded DNA to the recipient cell presumably occurs through the mating pore, a type IV secretion system formed by proteins encoded by *tra* genes that are distantly related to those borne by IncA/C conjugative plasmids (Wozniak *et al.*, 2009). Within the recipient cell, host enzymes convert the transferred single-stranded DNA into double-stranded DNA that can be recircularized and/or recombined into the chromosome.

SXT, a prototypical member of the SXT/R391 family originally isolated from a 1992 Indian *V. cholerae* O139 isolate (Waldor *et al.*, 1996), has been shown to be able to mobilize non-conjugative plasmids in *cis* and in *trans* as well as chromosomal DNA in an Hfr-like manner (Hochhut *et al.*, 2000). In this study we report that mobilization properties of the members of the SXT/R391 family expand to a new family of GIs that are genetically and functionally unrelated to SXT/R391 ICEs. Excision of these GIs from the chromosome was found to be entirely dependent upon the presence of an SXT/R391 ICE. Their transfer appeared to rely on the recognition of a similar but not identical *oriT* by the ICE-encoded relaxase. We also show that the presence of such a GI inserted into the chromosome of a donor strain enhances considerably the ability of an SXT/R391 ICE to mobilize chromosomal DNA to a recipient strain. Based on these results, the influence of the SXT/R391 ICEs on the evolution of the genomes of vibrios and other related aquatic-dwelling γ -proteobacteria could be broader and more complex than previously reported (Hochhut *et al.*, 2000, Wozniak *et al.*, 2009).

Results

Vibrio* genomic islands harbor a sequence resembling SXT/R391 *oriT

The origin of transfer is a highly conserved feature (>94% identity) of the SXT/R391 family of ICEs (Ceccarelli *et al.*, 2008, Wozniak *et al.*, 2009). Nevertheless, we wondered whether a similar sequence could be found in other mobile elements (conjugative or mobilizable plasmids) of the *Vibrionaceae*. Surprisingly, nucleotide Blast analysis of *oriT_{SXT}* against the GenBank database revealed significant sequence similarities (>63% identity) with a chromosomal intergenic region in *V. cholerae* RC385 and *V. vulnificus* YJ016 (Fig. 1A and 1B, Table 1).

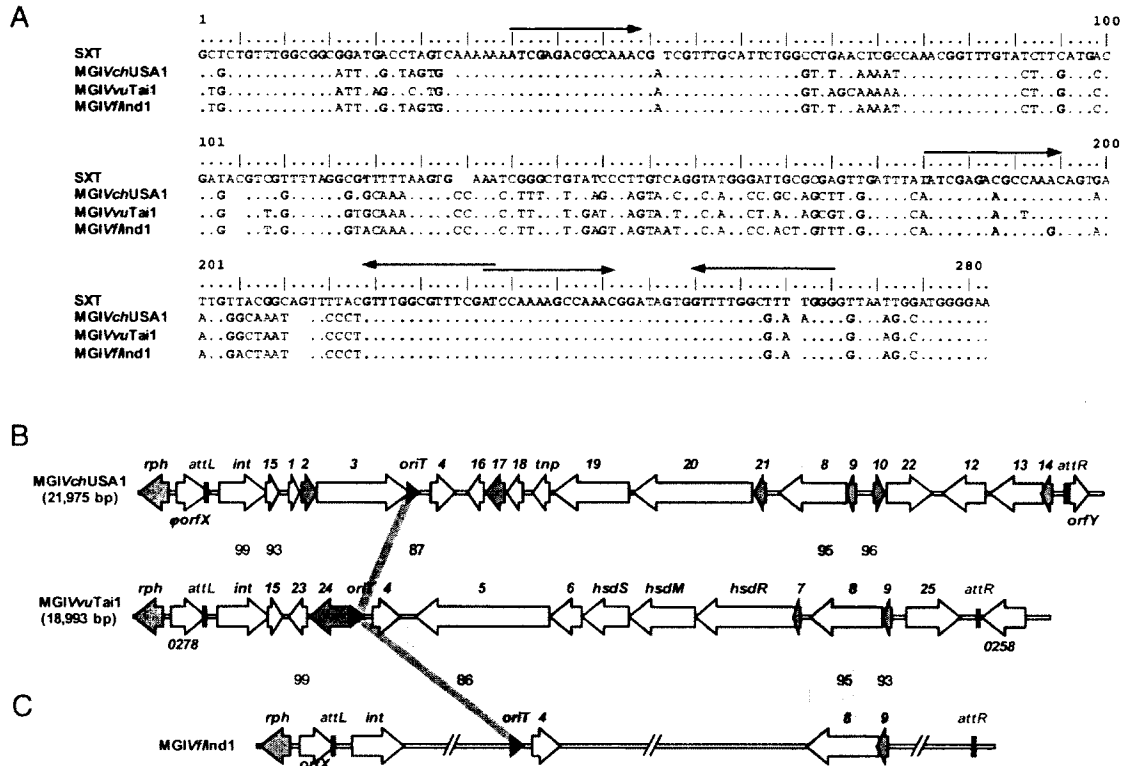


Fig. 1. A sequence related to the *oriT* of SXT/R391 ICEs is found in GIs. (A) ClustalW2 alignment of *oriT*_{SXT} with related sequences found in three distinct GIs. Identical nucleotides in the genomic islands are represented by dots, whereas nucleotide polymorphisms are indicated at the corresponding positions. The imperfect direct and indirect repeats in *oriT*_{SXT} are shown by arrows and shaded boxes. GenBank accession number for *oriT*MGIVflnd1 is GU930738. **(B)** Comparison of the structure of MGIVchUSA1 from *V. cholerae* RC385 (GenBank NZ_AAKH02000003.1) and MGIVvuTail from *V. vulnificus* YJ016 (GenBank BA000037.2). Numbers shown in the middle represent the percentage of identity between orthologous proteins encoded by the two GIs. Colors of the predicted open reading frames indicate the following putative functions: purple, translation, ribosomal structure and biogenesis; pink, DNA replication, recombination and repair; blue, transcription; green, restriction-modification system; orange, putative HipA-like toxin; grey, unknown function. **(C)** Predicted structure of the GI detected in *V. fluvialis* H-08942. Conserved genes and sequences detected by PCR are shown.

Our analysis of the two genomes did not reveal any molecular arrangement typical of SXT/R391 ICEs. No *tra* or *mob* genes that are typically conserved in these conjugative elements were found (Wozniak *et al.*, 2009). Instead, the two *oriT_{SXT}*-like loci are part of two GIs that are integrated into the 3' end of a gene coding for an uncharacterized stress-induced protein and are flanked by 23-bp direct repeats corresponding to the core sequences of *attL* and *attR* attachment sites (Fig. 1B and S1A). Downstream of *attL*, they bear a conserved gene (*int_{MGI}*) encoding a putative site-specific P4-type tyrosine recombinase distantly related to Int_{SXT} (25% identity). The two GIs exhibit heterogeneous gene contents with only five genes (*int_{MGI}*, *cds4*, *cds8*, *cds9* and *cds15*) conserved in both structures (Figure 1B, Table S1 and S2), four of which being of unknown function. The GI found in *V. cholerae* RC385 encodes two distinct putative toxin/antitoxin systems that are related to *E. coli*'s HipAB. HipAB is known to promote the formation of dormant cells called persisters that are associated with multidrug tolerance (Schumacher *et al.*, 2009). The GI detected in *V. vulnificus* YJ016, previously annotated as VVI-III (Quirke *et al.*, 2006), encodes a putative type I restriction-modification system (HsdRMS). Bacteria encoding restriction-modification systems are usually less susceptible to phage infection (Wilson *et al.*, 1991), which would be advantageous in the aquatic environment where bacteriophages thrive.

In an attempt to identify other related GIs, we screened by dot-blot hybridization using *int_{MGI}* as a probe a collection of 17 clinical and environmental *Vibrio* strains isolated in Angola, Bangladesh, India, Mexico and Mozambique. One additional related GI was identified in *V. fluvialis* H-08942, a clinical isolate from India (Table 1). Based on PCR amplification and partial DNA sequencing, we found that this GI contains an *oriT_{SXT}*-like sequence, *int_{MGI}*, *cds4*, *cds8* and *cds9*, and is integrated into the 3' end of the same conserved gene (Fig. 1C).

A ClustalW2 alignment of the *oriT*_{SXT}-like sequences found in the 3 GIs with *oriT*_{SXT} revealed the conservation of imperfect direct and inverted repeats that have been previously identified in *oriT*_{SXT} (Ceccarelli *et al.*, 2008) (Fig. 1A). Such structures could play a role in the specific recognition of *oriT* by the putative relaxase TraI and/or accessory proteins during conjugative transfer initiation. In contrast, regions located between these repeats are more dissimilar to *oriT*_{SXT}; yet they are highly conserved among the three GIs.

For reasons that will become clear below, from this point on these GIs are referred to as MGIs for Mobilizable Genomic Islands. As for their nomenclature, we applied the rules previously defined for ICEs of the SXT/R391 family (Burrus *et al.*, 2006). For example, the MGI found in *V. vulnificus* YJ016 from Taiwan, was named MGIVvuTail.

Recognition of the *oriT*_{MGI} sequences by the conjugative machinery of SXT

Based upon these findings, we hypothesized that SXT/R391 ICEs could mediate the transfer of co-resident MGIs to an MGI-free bacterial host. To demonstrate that the conjugative machinery of SXT could recognize the *oriT*_{MGI} sequences, mating experiments were carried out using as donors *E. coli* strains bearing the excision-deficient mutant SXT Δint_{SXT} (VB95 derivatives) (Ceccarelli *et al.*, 2008) and pACYC184-derivative plasmids containing either *oriT*_{SXT} (control plasmid pMRA-M) or an *oriT*_{MGI} sequence. As expected no exconjugant was detected when the empty vector was used, since pACYC184 is not mobilizable (Fig. 2). In contrast, the two plasmids containing *oriT*_{MGIVchUSA1} or *oriT*_{MGIVvuTail} sequences were mobilized by SXT Δint_{SXT} at frequencies comparable to that of the same vector containing *oriT*_{SXT}. Therefore, the conjugative machinery encoded by SXT recognizes the *oriT*_{MGI} sequences, despite their ~37% divergence from *oriT*_{SXT} and the absence of any MGI-encoded protein in the donor or recipient cells.

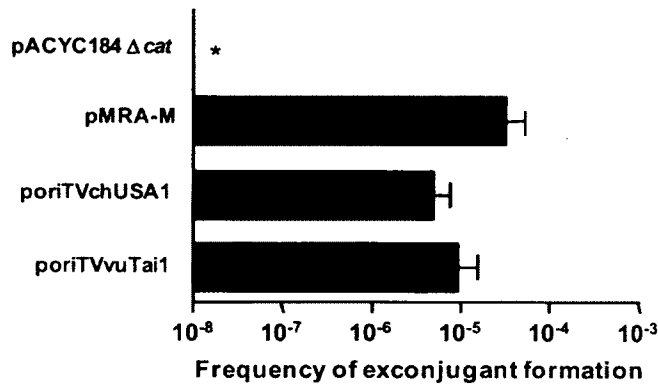


Fig. 2. Recognition of *oriT* of the MGIs by the conjugative machinery of SXT/R391 ICEs. Mobilization assays of derivatives of the non-mobilizable vector pACYC184 Δcat , containing the *oriT* of SXT (pMRA-M), MGIV ch USA1 or MGIV vu Tai1 were carried out using *E. coli* CAG18420 SXT Δint (VB95) as the donor strain. The use of SXT Δint ensures that plasmid mobilization does not occur by cointegration into and subsequent transfer with SXT to the recipient. *E. coli* VB112 (Rf^R) was used as the recipient strain. The frequency of exconjugant formation was obtained by dividing the number of exconjugants (Tc^R Rf^R CFU) by the number of donors (Kn^R CFU). The bars indicate the mean values and standard deviations obtained from three independent experiments. The asterisk indicates that the frequency of exconjugant formation was below the limit of detection (1×10^{-8}).

The MGI found in *V. fluvialis* is mobilizable by ICEV fl Ind1

V. fluvialis H-08942, which contains MGIV fl Ind1, also bears ICEV fl Ind1, a member of the SXT/R391 family that confers the same antibiotic resistance as SXT (Ahmed *et al.*, 2005). We attempted to recover MGIV fl Ind1 in *E. coli* by carrying out mating experiments between *V. fluvialis* and *E. coli*. Since MGIV fl Ind1 lacks any known selectable marker, we selected for exconjugants that received ICEV fl Ind1, hoping that MGIV fl Ind1 would co-transfer. Twenty ICE⁺ exconjugant colonies were purified and tested by PCR to specifically amplify *oriT*_{MGI}. Surprisingly, even in the absence of any selective pressure, *oriT*_{MGI}⁺

exconjugants were found confirming that MGIV ϕ Ind1 transferred from *V. fluvialis* to *E. coli* at high frequency.

To easily monitor MGIV ϕ Ind1 transfer, we introduced a Kn^R marker (*aph*) into its *cds4-cds5* intergenic region (AD63). Mobilization assays between *E. coli* strains, revealed that MGIV ϕ Ind1::*aph* does not transfer in the absence of an SXT/R391 ICE ($<1.6 \times 10^{-8}$ exconjugant per donor). In contrast, when ICEV ϕ Ind1 was coresident in the donor cells, both elements transferred at comparable frequencies (Fig. 3A). Therefore MGIV ϕ Ind1 appears to take advantage of the conjugative machinery encoded by ICEV ϕ Ind1 to transfer to the recipient cells. The frequency of co-transfer was only slightly lower than the transfer frequencies of each individual element suggesting that transfer of MGIV ϕ Ind1 was dependent upon transfer of ICEV ϕ Ind1. We investigated the transfer of one element upon selection of the other among 180 exconjugant selected for MGIV ϕ Ind1 (Kn^R) and 180 exconjugants selected for ICEV ϕ Ind1 (Su^R Tm^R). We observed that 1.67% of the colonies selected on Kn (MGI⁺) were also Su^R Tm^R (ICE⁺) whereas 16.67% of the colonies selected on Su Tm (ICE⁺) were also Kn^R (MGI⁺). These results indicate that while the MGI relies on the ICE to transfer to the recipient cells, both elements do not systematically co-transfer to the same recipient and that the MGI transfers more efficiently than the ICE. The smaller size of the MGI compared to the ICE could explain this difference. Alternatively, higher frequency of excision or possible replication of the MGI could account for this phenomenon.

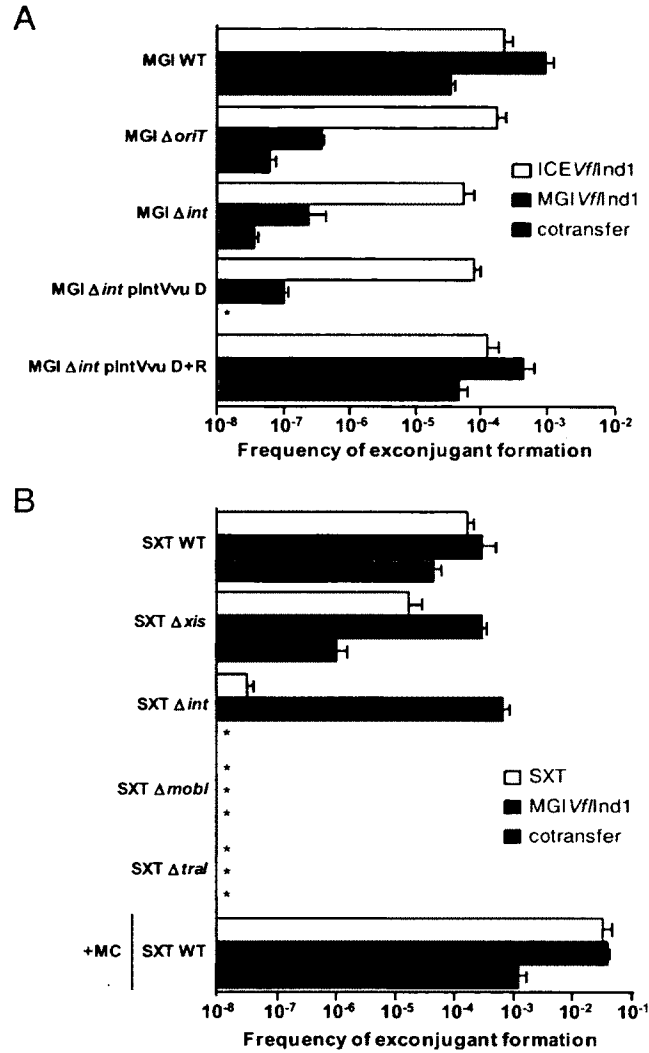


Fig. 3. Genetic requirements for mobilization of MGIVfInd1. (A) Mobilization assays of MGIVfInd1::aph or its $\Delta oriT$ or Δint mutants by ICEVfInd1 were carried out using *E. coli* CAG18439 containing ICEVfInd1 and MGIVfInd1 mutants as donor. When indicated, donor (D) or donor and recipient strains (D+R) expressed Int_{MGI} from pIntVvu. *E. coli* VB112 (Rf^R) was used as the recipient strain. (B) Mobilization assays of MGIVfInd1::aph were carried out using derivatives of *E. coli* AD64 containing SXT or its Δxis , Δint , $\Delta mobI$ or $\Delta tral$ mutants. *E. coli* CAG18439 was used as the recipient strain. The frequency of exconjugant formation was determined by dividing the number of exconjugants (Tc^R Su^R Tm^R CFU for SXT, Tc^R Kn^R CFU for MGIVfInd1, or Tc^R Kn^R Su^R Tm^R CFU for co-

transfer of SXT and MGIV ϕ Ind1) by the number of donors (Rf^R CFU). When indicated, mitomycin C was used to induce the SOS response. The bars indicate the mean values and standard deviations obtained from three independent experiments. The asterisks indicate that the frequency of exconjugant formation was below the limit of detection (1×10^{-8}).

To verify that MGIV ϕ Ind1 transfer was dependent upon the *cis*-acting *oriT*_{MGI}, we constructed a $\Delta oriT_{MGI}::aad7$ mutant of MGIV ϕ Ind1 (AD80). The mutation reduced the frequency of transfer of MGIV ϕ Ind1 as much as 2,300 fold compared to wild-type (Fig. 3A) suggesting that the conjugative machinery of the ICE recognizes *oriT*_{MGI} to mobilize the MGI. As already reported for an SXT mutant lacking *oriT*_{SXT} (Ceccarelli *et al.*, 2008), residual transfer of the $\Delta oriT_{MGI}$ mutant of MGIV ϕ Ind1 was observed. This result is likely due to low-frequency non-specific initiation of conjugative transfer by the relaxase at secondary or random sites on the circularized MGI.

ICE-borne DNA processing genes are required for MGIV ϕ Ind1 transfer

We investigated whether ICE-borne genes involved in the integration and excision (*int*_{SXT} and *xis*) of the SXT/R391 ICEs or in the initiation of transfer at *oriT*_{SXT} (*mobI* and *traI*) were required for MGI transfer (Hochhut *et al.*, 1999, Burrus *et al.*, 2003, Ceccarelli *et al.*, 2008). *E. coli* strains containing various SXT deletion mutants and coresident MGIV ϕ Ind1::*aph* were used as donors in mating assays (Fig. 3B). While deletion of either *int*_{SXT} or *xis* affected SXT transfer as previously reported (Burrus *et al.*, 2003), it had no influence on MGIV ϕ Ind1 transfer. Several conclusions can be drawn from these data. Like ICE ϕ Ind1, SXT is able to mediate MGIV ϕ Ind1 transfer. MGIV ϕ Ind1 transfer appears to be independent of SXT transfer to the recipient cell. Additionally, *int*_{SXT} and *xis* play no role in the excision, transfer or integration of the MGI suggesting that Int_{MGI} likely mediates MGIV ϕ Ind1 excision and integration instead.

The absence of *mobI* or *traI* abolished the transfer of both SXT and MGIV ϕ Ind1 (Fig. 3B). Together with the mobilization by SXT Δint of plasmids containing distinct *oriT*_{MGI}

sequences (Fig. 2), these results suggest that ICE-encoded MobI and the putative relaxase TraI recognize *oriT*_{MGI} to promote MGIs' transfer to the recipient cells.

Int_{MGI} mediates the integration of MGIs into the conserved gene *yicC* in *E. coli*

To establish that *int*_{MGI} is responsible for the integration and excision of MGIs, we used an *E. coli* donor strain containing ICEV ϕ Ind1 and the coresident deletion mutant MGIV ϕ Ind1 Δ *int*_{MGI}::*aad7* (AD81) in mating assays (Fig. 3A). Deletion of *int*_{MGI} reduced the frequency of transfer of MGIV ϕ Ind1 by ~3,700 fold compared to the wild-type. To understand the origin of the residual transfer observed for this mutant, we tested by PCR each exconjugant for the presence of *cds9*, a gene located between *oriT*_{MGIV ϕ Ind1} and *attR* (Fig. 1C). No PCR product was detected for any of the exconjugants (data not shown), suggesting that the Sp^R marker was transferred to the recipient cells in an Hfr-like manner from MGIV ϕ Ind1. The integrase expressed from pIntVvu (Table 1) complemented the Δ *int*_{MGI}::*aad7* mutation only when the plasmid was provided both in the donor and recipient cells (Fig. 3A). This requirement suggests that the integrase protein must be synthesized *de novo* in the recipient cell to promote MGIV ϕ Ind1 integration into the recipient's chromosome, practically ruling out direct transfer of this protein from donor to recipient through the mating pore.

To identify the integration site for MGIV ϕ Ind1 in *E. coli*, we sought by nucleotide Blast analysis for an ortholog of VV0278 of *V. vulnificus* YJ016, the locus within which MGIVvuTail is integrated (Fig. 1B, Table S2), in the genome of *E. coli* K12 MG1655. *yicC*, a gene of unknown function, was identified as the closest match (68% identity). The potential 23-bp *attB* sequence in *E. coli* differs at only two positions from *attB* in the MGI-free strain *V. cholerae* N16961 (Fig. S1A). Using primer pairs specific to the ends of the MGIs and to sequences flanking the 3' end of *yicC* (Table S3), we amplified the *attL* and *attR* sites in three independent *E. coli* MGIV ϕ Ind1::aph exconjugants. Each produced amplicons of expected size (587 bp and 608 bp, respectively) confirming that MGIV ϕ Ind1 integrates into the 3' end of *yicC* in *E. coli*. By comparing the sequences of the *attL* and

attR sites as well as *attP* sites resulting from MGIV ϕ Ind1 excision in the three *E. coli* exconjugants and in *V. fluvialis* H-08942, we determined the overlap region where strand exchange takes place (Fig. S1B).

ICEV ϕ Ind1 mobilizes chromosomal DNA *in trans* through MGIV ϕ Ind1

Low-frequency mobilization of the Sp^R marker using donor cells bearing MGIV ϕ Ind1 Δ int_{MGI}::*aad7* and ICEV ϕ Ind1 (AD81) suggested that MGIV ϕ Ind1 could mobilize chromosomal DNA located 5' of its integration site, *yicC*. To test this hypothesis, we introduced ICEV ϕ Ind1 and MGIV ϕ Ind1::aph into a set of MG1655 derivatives carrying single Tn10 (Tc^R) insertions at different sites on the chromosome (Fig. 4A, Table 1) and tested the transfer of the Tc^R marker to a Rf^R *E. coli* recipient (VB112). The same strains devoid of MGI and ICE or harboring only ICEV ϕ Ind1 were used as negative controls to determine the frequency of spontaneous Rf^R mutants or to monitor the transfer of the Tc^R marker driven from *prfC*, the integration site of ICEV ϕ Ind1. Transfer of Tn10 inserted into *yddE* revealed that ICEV ϕ Ind1 alone is able to mobilize *in cis* chromosomal DNA up to 1.5 Mb in 3' of *prfC*, a 3-fold increase compared to the value that has been previously reported for SXT by Hochhut et al (Hochhut *et al.*, 2000). The frequency of formation of Rf^R Tc^R exconjugants was ~100 fold above background level in the presence of both MGIV ϕ Ind1 and ICEV ϕ Ind1 for Tn10 insertions located up to 500 kb upstream of *yicC* (Fig. 4B). Transfer of Tn10 was still detectable up to ~1 Mb in 5' of *yicC* (*srlD* locus). This result demonstrates that ICEV ϕ Ind1 inserted into *prfC* is able to mobilize *in trans* chromosomal DNA located 5' of *yicC*, through the recognition of the *oriT*_{MGI} locus located in MGIV ϕ Ind1. Transfer of Tn10 inserted into *fadA*, downstream of *yicC*, was not statistically different from background suggesting that, as reported for SXT (Hochhut *et al.*, 2000), chromosomal DNA transfer driven from *oriT*_{MGI} is directional.

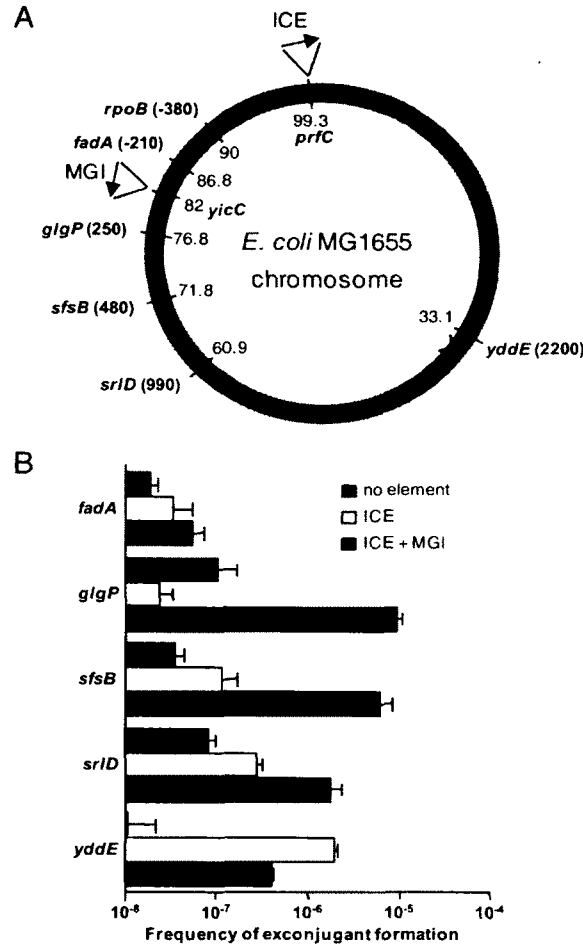


Fig. 4. Hfr-like mobilization of chromosomal DNA by MGI/Ind1 driven by ICE/Ind1. (A) Map of the Tn10 insertions. Positions of Tn10 insertions on the chromosome of the donor strains were determined by Singer *et al.* (Singer *et al.*, 1989) and Nichols *et al.* (Nichols *et al.*, 1998). For each gene disrupted by Tn10, the position in minutes (on the inside of the circle) and the distance in kb relative to *yicC* are shown. The relative positions of *rpoB* (R_f^R), *prfC*, *yicC*, the origin (\diamond) and terminus (\times) of replication are also indicated. Orientation of the *oriT* sequences in the MGI and the ICE are indicated by arrows. (B) Mobilization of the Tn10 markers. Donor (Tc^R) and recipient (VB112, R_f^R) strains are described in table 1. The frequency of transfer was calculated by dividing the number of exconjugants ($R_f^R Tc^R$) by the number of donors ($Tc^R Su^R Tm^R$). The bars

indicate the mean values and standard deviations obtained from three independent experiments.

An SXT/R391-encoded transcriptional activator triggers the excision of the MGIs

Given the conservation of *int*_{MGI}, and of the flanking *attL* and *attR* sites, we hypothesized that all the MGIs identified in this study would excise regardless of the genetic background of the host strain. We tested the three *int*_{MGI}⁺ strains by nested inverse PCR to amplify *attP* sequences resulting from MGIs' excision. We found that only the strain containing an SXT/R391 ICE yielded a PCR product of expected size (Fig. 5A, lane 1). Sequence analysis of the amplicon confirmed the excision event (Fig. S1A), indicating that MGIV/Ind1 is able to form a circular intermediate (Fig. 5B). Unexpectedly, the two ICE-free strains, *V. cholerae* RC385 and *V. vulnificus* YJ016, failed to yield the proper amplicons (Fig. 5A, lane 2 and 3). Failure to detect the excision of the MGIs found in these two strains suggests that these elements are not functional. Alternatively, MGIs could require the presence of SXT/R391 ICEs to excise.

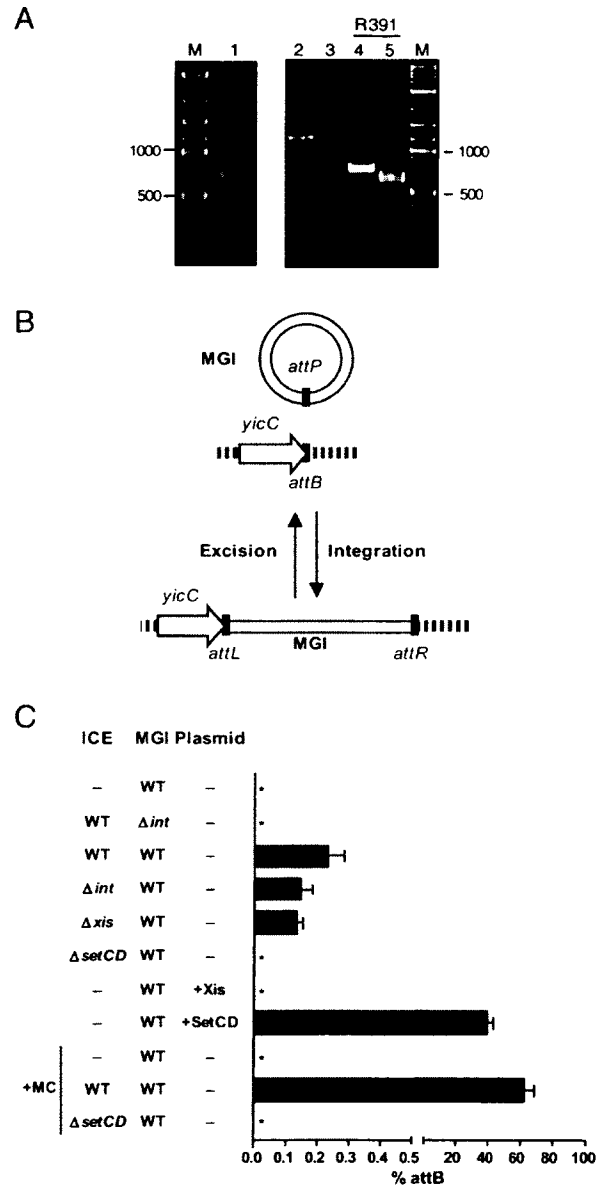


Fig. 5. ICEs of the SXT/R391 family trigger the site-specific excision of the MGIs. (A) Ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel of PCR products amplified by nested inverse PCR assays for detection of MGIs' excision. Lanes: M, 2-Log DNA ladder; 1, MGIV Δ Ind1; 2 and 4, MGIV Δ chUSA1; 3 and 5, MGIV Δ vuTail. Lanes 4 and 5, coresident R391 was present in the cells. **(B)** Model of excision/integration of an MGI by site-specific recombination. **(C)** Percentage of unoccupied *attB* sites resulting from the circularization of MGIV Δ Ind1 or

of a Δint mutant in *E. coli* CAG18439 harboring derivatives of SXT, or pXis (+Xis) or pGG2B (+SetCD). When indicated, mitomycin C was used to induce the SOS response. Triplicate measurements were obtained for each sample, and the mean values and standard deviations are shown. Asterisks indicate that excision was below background level (0.0004%).

To test this hypothesis, we introduced R391, the other prototypical member of the SXT/R391 family originally from *Providencia rettgeri* (Wozniak *et al.*, 2009), into the two ICE⁻ MGI⁺ strains and repeated the same PCR experiment on the R391⁺ exconjugants. In each case, amplicons of the expected size were detected (Fig. 5A, lane 4 and 5), confirming that ICEs of the SXT/R391 family activate MGIs' excision. To investigate further this observation, real-time quantitative PCR assays were used to measure the percentage of cells in a culture containing unoccupied *attB* sites (a measure of the amounts of excised circularized MGI) for *E. coli* bearing MGIV ϕ Ind1 in various genetic backgrounds (Fig. 5C). The assays were also carried out with an MGIV ϕ Ind1-free *E. coli* strain as a control, which contains one copy of *attB* per chromosome. We found that MGIV ϕ Ind1 excision was virtually undetectable in the absence of SXT or when a Δint_{MGI} MGIV ϕ Ind1 mutant was used (Fig. 5C). In contrast, deletion of either *int*_{SXT} or *xis* in SXT, which are critical for SXT excision (Burrus *et al.*, 2003), did not significantly diminish the frequency of excision of MGIV ϕ Ind1. Likewise, in the absence of SXT, overexpression of *xis* from pXis did not promote MGIV ϕ Ind1 excision. These results confirm that neither gene promotes MGIs' excision and that SXT Xis protein is not a recombination directionality factor for the MGIs. Finally, we observed that deletion of *setCD*, the genes encoding the main transcriptional activators of SXT's *tra* and *int* genes (Beaber *et al.*, 2002), completely abolished MGIV ϕ Ind1 excision (Fig. 5C). To verify that activation of MGI excision by SXT was not due to an interaction with an SXT-encoded factor regulated by SetCD, we expressed SetCD under control of an arabinose-inducible promoter in the absence of SXT. Overexpression of SetCD led to more than a 100-fold increase in the percentage of cells bearing a circularized

MGIV/Ind1, indicating a direct stimulation of MGI excision mediated by the ICE transcriptional activator SetCD.

SOS response promotes the excision and transfer of MGIV/Ind1

Conjugative transfer of the ICEs of the SXT/R391 family is activated by the SOS response via self-cleavage of the repressor SetR driven by RecA's co-protease activity and consecutive activation of the expression of activators SetCD (Beaber *et al.*, 2004). To investigate the impact of the SOS response on MGI transfer, we carried out mating and excision experiments in the presence of a DNA damaging agent to stimulate the SOS response. Induction was obtained by growing MGIV/Ind1-containing *E. coli* cells in sublethal concentrations of mitomycin C. The presence of mitomycin C augmented the transfer frequency of SXT and MGIV/Ind1 by ~190 and 130 fold, respectively (Fig. 3B).

We hypothesized that the augmentation of MGIV/Ind1 mobilization was a consequence of an increase of the excision frequency. Quantitative PCR experiments revealed that the amount of *attB* is significantly enhanced in the presence of mitomycin C (~270 fold) but remains below the detection level in the absence of an SXT/R391 ICE or when the cells carry SXT $\Delta setCD$ (Fig. 5C). These results confirm that the augmentation of transfer frequency of MGIV/Ind1 observed under SOS response induction is, at least in part, linked to the augmentation of the free circular form of the MGI in the cells controlled by SXT-encoded SetCD.

Discussion

In most cases, the mechanisms of acquisition and exchange of GIs between bacteria are unknown. A few GIs have been found to be able to excise from the chromosome but their transfer has never been detected (Blum *et al.*, 1994, Middendorf *et al.*, 2004, Hochhut *et al.*, 2006). Recently Murphy and Boyd reported the excision and circularization of the three pathogenicity islands VPI-2, VSP-I and VSP-II, found in seventh pandemic *V. cholerae* isolates (Murphy *et al.*, 2008). Collectively, our results demonstrate that ICEs of the SXT/R391 family trigger the excision of a new class of GIs found in three species of vibrios and promote their conjugative transfer through the direct recognition of a similar *oriT*.

To date the mechanism of transfer of only a handful of GIs has been elucidated. Transduction appears to be an important mechanism of GI transfer. The 15- to 17-kb *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI), which commonly encode the toxic shock syndrome (TSST-1) and superantigen toxins, have been shown to be excised and circularized by staphylococcal phages, which transduce them at very high frequency after encapsidation into infectious small-headed phage-like particles (Novick *et al.*, 2007). Transfer of GIs driven by conjugative elements has also been reported. The High Pathogenic Island (HPI) which encodes the siderophore yersiniabactin in many *Enterobacteriaceae* has often been found to be physically linked to ICEs and mobilized *in cis* by them (Schubert *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2008, Paauw *et al.*). Mobilizable transposons such as the NBUs (Nonreplicating *Bacteroides* Units) and Tn4555 in *Bacteroides* have been shown to be excised and mobilized *in trans* by tetracycline-inducible *Bacteroides* conjugative transposons (Smith *et al.*, 1993, Li *et al.*, 1995, Salyers *et al.*, 1995a). In all these cases, the mobilizable elements encode their own relaxase and have their own *oriT*, usually unrelated to the *oriT* of the mobilizing element. One known exception is MTnSag1, a 1,724-bp element from *Streptococcus agalactiae*, which harbors a short 60-bp sequence vaguely resembling a segment of the *oriT* of the conjugative transposon Tn916 (Achard *et*

al., 2007). This *oriT*-like sequence is atypically found at the 3' end of a gene conferring resistance to lincomycin and allows low frequency mobilization (10^{-8} to 10^{-7}) of MTnSag1 by a coresident Tn916. However, it has been reported that addition of subinhibitory concentrations of tetracycline, which is known to strongly increase Tn916 conjugative transfer, did not enhance the mobilization of MTnSag1. This suggests that recognition of an *oriT*-like sequence in MTnSag1 by the conjugative machinery of Tn916 might only be fortuitous.

In contrast, our observations suggest a specific adaptation of MGIs to the lifestyle of SXT/R391 ICEs on two levels: (i) the recognition of the large 299-bp *oriT* and (ii) the activation of the excision and circularization of the MGIs by the ICE-encoded transcriptional activator SetCD. Activation of MGI's excision by SXT/R391 ICEs emphasizes the opportunistic behavior of this class of GIs and is similar to observations reported for NBUs excision controlled by conjugative transposons in *Bacteroides*. In this case, the two-component regulatory system RteA-RteB, which is encoded by CTnDOT, directly activates the NBU1 excision genes (Shoemaker *et al.*, 2000, Moon *et al.*, 2005, Song *et al.*, 2009). The production of RteA-RteB is stimulated by tetracycline and is controlled at the translational level by translational attenuation.

We propose a model of mobilization of MGIs by ICEs of the SXT/R391 family in figure 6. In the absence of an ICE, the MGI remains integrated into the chromosome, avoiding loss that could occur upon cell division while the element is in its plasmid-like form. In contrast, in the presence of an ICE, the MGI excises and takes advantage of the ICE-encoded conjugative machinery to disseminate in the cell population. MGIs' excision and transfer are triggered by the DNA damaging agent mitomycin C. Based on previous report regarding the stimulation of SXT transfer (Beaber *et al.*, 2004), other environmental conditions promoting the formation of DNA damages that stimulate the SOS response (UV light or the presence of antibiotics such as ciprofloxacin) are likely to trigger MGI mobilization. SetCD, which is expressed during SOS response, acts as a transcriptional

activator of the SXT transfer (*tra*) and integration/excision (*xis/int*) genes (Beaber *et al.*, 2004). We showed that expressed alone in the absence of an ICE, SetCD was sufficient to stimulate MGIV ϕ Ind1 excision; yet it is not clear whether, in this case, SetCD acts as a transcriptional activator, allowing expression of Int_{MGI}, which is required for the excision, or directly as a recombination directionality factor (RDF). Bacteriophages, GIs and ICEs usually encode their own RDF to assist the site-specific recombinase Int in catalyzing the excision of the element. The MGIs described in this study did not appear to encode any obvious RDF closely related to any known excisionase. However, further analysis of the 4 genes conserved in the three MGIs revealed that the translation product of *cds9* could be a potential RDF candidate (Table S1 and S2). Detailed studies of the role of *cds9* and SetCD in the excision of MGIV ϕ Ind1 are ongoing.

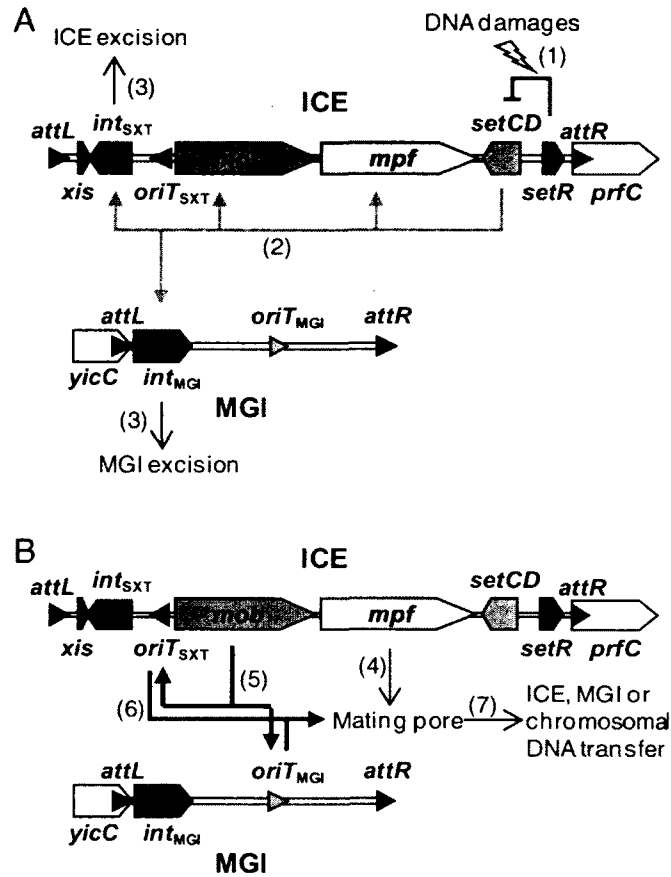


Fig. 6. Model of ICE-mediated mobilization of an MGI. (A) Induction of excision. (1) DNA damaging agents trigger the SOS response, alleviating the SetR-mediated repression of *setCD*. (2) The transcriptional activator SetCD activates the expression of *mob* genes (*mobI* and *traI*) and *mpf* operons (*tra* genes). SetCD also activates the expression of *int_{SXT}* and, directly or indirectly, the expression of *int_{MGI}*. (3) While *Int_{SXT}* catalyzes the excision of the ICE, *Int_{MGI}* mediates the excision of the MGI. (B) Conjugative transfer. (4) Expression of the *mpf* operons leads to the formation of the mating pore that will connect the donor and recipient cells, and deliver the DNA. (5) The *mob* genes produce the mobilization proteins that will recognize, bind to and cleave *oriT_{SXT}* and/or *oriT_{MGI}*. (6) The nicked DNA bound to TraI is directed to the mating pore. (7) Depending on whether the ICE or the MGI is excised prior to initiation of DNA transfer, translocation of the whole ICE or MGI, or of chromosomal DNA will occur.

SXT has been previously reported to mobilize up to ~500 kb of chromosomal DNA located 3' of *prfC* in an Hfr-like manner between *E. coli* strains (Hochhut *et al.*, 2000). We demonstrated that SXT/R391 ICEs such as ICE V_{flnD1} were also able to mobilize *in trans* up to 1 Mb of chromosomal DNA through an MGI in *E. coli*. This finding suggests new importance of the SXT/R391 ICEs on genomic plasticity of the *Vibrionaceae*. In this new era of systematic sequencing of microbial genomes, large stretches of DNA in 3' of *prfC* and 5' of *yicC* could be examined in *Vibrio* species to identify loci that could have been exchanged by ICEs and MGIs. Genes encoding colonization or virulence factors could possibly be under the influence of ICEs and MGIs leading to the pathogenic evolution of environmental lineages of *V. cholerae*, *V. fluvialis* or *V. vulnificus*.

The novel properties attributed to the ICEs of the SXT/R391 family lead us to reconsider their impact on the plasticity of bacterial genomes, and suggest that the role of ICEs in the evolution of their bacterial hosts is broader than originally thought. We predict that this report will constitute the starting point of a long list of GIs mobilized by conjugative elements due to similar *oriTs*. Recently the broad-host-range conjugative plasmid R1162 was reported to be able to recognize cryptic *oriTs* on the chromosome of *Pectobacterium atrosepticum* and to mobilize chromosomal DNA from one of these loci (Meyer, 2009). Based on these and our results, we also predict that mobilization of GIs and chromosomal DNA by other conjugative elements through the recognition of similar *oriTs* is a common phenomenon. Therefore we propose that *oriTs* of known and newly discovered conjugative elements should be systematically identified and characterized in order to provide the basis to identify potential mobilizing elements of GIs.

Experimental procedures

Bacterial strains and DNA manipulation. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. The strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C in an orbital shaker/incubator and were maintained at -80°C in LB broth containing 15% (vol/vol) glycerol. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin (Ap), 100 µg/ml; kanamycin (Kn), 50 µg/ml; mitomycin C, 100 ng/ml; rifampicin (Rf), 50 µg/ml; spectinomycin (Sp), 50 µg/ml; sulfamethoxazole (Su), 160 µg/ml; tetracycline (Tc), 12 µg/ml; and trimethoprim (Tm), 32 µg/ml.

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant genotype or phenotype ^a	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
CAG12072	MG1655 <i>sfsB203::Tn10</i> (Tc ^R)	(Singer <i>et al.</i> , 1989)
CAG18420	MG1655 <i>lacZU118 lacI42::Tn10kan</i> (Kn ^R)	(Singer <i>et al.</i> , 1989)
CAG18439	MG1655 <i>lacZU118 lacI42::Tn10</i> (Tc ^R)	(Singer <i>et al.</i> , 1989)
CAG18461	MG1655 <i>yddE::Tn10</i> (Tc ^R)	(Singer <i>et al.</i> , 1989)
CAG18496	MG1655 <i>fadA::Tn10</i> (Tc ^R)	(Singer <i>et al.</i> , 1989)
CAG18638	MG1655 <i>glgP::Tn10</i> (Tc ^R)	(Singer <i>et al.</i> , 1989)
CAG18642	MG1655 <i>srlD::Tn10</i> (Tc ^R)	(Singer <i>et al.</i> , 1989)
VB95	CAG18420 <i>prfC::SXT Δint</i> (Kn ^R Su ^R Tm ^R)	(Ceccarelli <i>et al.</i> , 2008)
VB112	MG1655 Rf ^R	(Ceccarelli <i>et al.</i> , 2008)
AD63	CAG18439 <i>prfC::ICEVflInd1 yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Tc ^R Su ^R Tm ^R Kn ^R)	This study
AD64	VB112 <i>yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Rf ^R Kn ^R)	This study
AD66	VB112 <i>prfC::SXT ΔmobI yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Rf ^R Su ^R Tm ^R Kn ^R)	This study
AD69	VB112 <i>prfC::SXT Δxis yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Rf ^R Su ^R Tm ^R Kn ^R)	This study
AD70	VB112 <i>prfC::SXT Δint yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Rf ^R Su ^R Tm ^R Kn ^R)	This study
AD72	VB112 <i>prfC::SXT yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Rf ^R Su ^R Tm ^R Kn ^R)	This study
AD80	CAG18439 <i>prfC::ICEVflInd1 yicC::MGIVflInd1 ΔoriT::aad7</i> (Tc ^R Su ^R Tm ^R Sp ^R)	This study
AD81	CAG18439 <i>prfC::ICEVflInd1 yicC::MGIVflInd1 Δint::aad7</i> (Tc ^R Su ^R Tm ^R Sp ^R)	This study
AD107	VB112 <i>prfC::SXT Δtral yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Rf ^R Su ^R Tm ^R Kn ^R)	This study
AD133	CAG18439 <i>prfC::SXT ΔsetCD yicC::MGIVflInd1::aph</i> (Tc ^R Su ^R Tm ^R Kn ^R)	D. Poulin-Laprade
<i>Vibrio</i> sp.		
<i>V. vulnificus</i> YJ016	MGIVvuTail, Clinical, Environmental, 1992, Taiwan	(Chen <i>et al.</i> , 2003)
<i>V. cholerae</i> RC385	O135, MGIVchUSA1, Environmental, 2005, USA	(Chun <i>et al.</i> , 2009)
<i>V. fluvialis</i> H-08942	ICEVflInd1 MGIVflInd1, Clinical, 2002, India	(Ahmed <i>et al.</i> , 2005)
Plasmids		
pACYC184 <i>Δcat</i>	pACYC184 <i>Δcat</i> (ΔMscI-PvuII; Tc ^R)	(Ceccarelli <i>et al.</i> , 2008)
pMRA-M	pACYC184 <i>Δcat oriT_{SXT}</i> (Tc ^R)	(Ceccarelli <i>et al.</i> , 2008)
poriTVchUSA1	pACYC184 <i>Δcat oriT_{MGIVchUSA1}</i> (Tc ^R)	This study
poriTVvuTail	pACYC184 <i>Δcat oriT_{MGIVvuTail}</i> (Tc ^R)	This study
pIntVvu	pBAD-TOPO <i>int_{MGIVvuTail}</i> (Ap ^R)	This study
pXis	pBAD-TOPO <i>xis</i> (Ap ^R)	(Burrus <i>et al.</i> , 2003)
pGG2B	pBAD30 <i>setCD</i> (Ap ^R)	G. Garriss
pKD13	PCR template for one-step chromosomal gene inactivation (Kn ^R)	(Datsenko <i>et al.</i> , 2000)
pVI36	PCR template for one-step chromosomal gene inactivation (Sp ^R)	(Ceccarelli <i>et al.</i> , 2008)

^a Ap^R, ampicillin resistant; Kn^R, kanamycin resistant; Rf^R, rifampicin resistant; Sp^R, spectinomycin resistant; Su^R, sulfamethoxazole resistant; Tc^R, tetracycline resistant; Tm^R, trimethoprim resistant.

Bacterial conjugation. Conjugation assays were used to transfer ICE ν /Ind1, SXT, R391, MGIV ν /Ind1 or plasmids into *E. coli*, *V. cholerae* or *V. vulnificus*. Mating assays were performed by mixing equal volumes of overnight cultures of donor and recipient strains. The cells were harvested by centrifugation and resuspended in a 1/20 volume of LB broth. Cell suspensions were poured onto LB agar plates and incubated at 37°C for 6h routinely or 15h for chromosomal DNA mobilization experiments. The cells were then resuspended in 1 ml of LB medium, and serial dilutions were plated onto appropriate selective media to determine the number of donors, recipients, and exconjugants. Frequency of transfer was expressed as the number of exconjugant cells per donor cells in the mating mixture at the time of plating. *E. coli* CAG18439 or a Rf-resistant derivative strain of *E. coli* MG1655 (VB112) were used as recipients in conjugation experiments (Table 1). When mitomycin C induction was needed, the overnight culture of the donor strain was diluted 1:4 into fresh medium and grown for 1h at 37°C. Mitomycin C was added at the appropriate concentration and cells were grown for a further 1h at 37°C. To induce expression of Int_{MGI} from pIntVvu (Table 1) in complementation assays, mating experiments were carried out on LB-agar plates supplemented with 0.02% arabinose.

Plasmid and strain construction. The plasmids and primers used in this study are described in Table 1 and S3, respectively. All of the pACYC184 Δ cat-derived plasmids used in mobilization experiments were constructed by cloning of XbaI-flanked PCR products into the XbaI site. Plasmids porITVchUSA1 and porITVvuTail were constructed using the primer pair oriT-F/oriT-R and genomic DNA of *V. cholerae* RC385 and *V. vulnificus* YJ016 as templates, respectively. Plasmid pIntVvu was constructed by cloning int_{MGI ν vuTail} into the TA cloning expression vector pBAD-TOPO (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The gene int_{MGI ν vuTail} was amplified by PCR using primers AD3-F and AD3-V-R1.

All deletion and insertion mutants were constructed in *E. coli* CAG18439 containing the ICE or MGI to modify by using the one-step chromosomal gene inactivation technique

(Datsenko *et al.*, 2000). All mutations were designed to be non-polar. The kanamycin-resistance gene *aph* was introduced into *MGI* Δ *Ind1* using the primer pair AD8-WF/AD8-WR and pKD13 as the template. The Δ *ori*_{MGI} and Δ *int*_{MGI} mutations were introduced in *MGI* Δ *Ind1* using primer pairs AD9-WF/AD9-WR and AD10-WF/AD10-WR, respectively, and pVI36 as the template. SXT Δ *tral* was constructed using primer pair TraIWF2/TraIWR3 and pKD13 as the template. All deletion mutations were verified by PCR amplification using primers flanking the deletion, cloning and sequencing. Construction of the Δ *xis* and Δ *mobI* mutations in SXT was described elsewhere (Burrus *et al.*, 2003, Ceccarelli *et al.*, 2008).

Molecular biology techniques. All the enzymes were used according to manufacturer's instructions (New England Biolabs). Plasmid DNA was prepared with a QIAprep spin mini prep kit (Qiagen), and chromosomal DNA was prepared with a Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) as described in the manufacturer's instructions. Colony blotting was performed with probes conjugated to horseradish peroxidase and detected with a chemiluminescent substrate (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Lysis of the colonies and binding of DNA to nylon membranes (Magma) was performed according to Sambrook and Russel (Sambrook *et al.*, 2001). Detection was achieved on Biomax light films (Kodak). Additionally, detection of *int*_{MGI} was carried out by PCR using primer pair intAD-F/intAD-R.

PCR assays were carried out in 50- μ l PCR mixtures with 1U of *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs). The PCR conditions were as follows: (i) 3 min at 94°C; (ii) 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at a suitable annealing temperature, and 30 s to 60 s at 72°C; and (iii) 5 min at 72°C. When needed, PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The purified PCR products or inserts of constructed plasmids were sequenced by DNA LandMarks, Inc. (Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada). DNA sequences were compared with the GenBank DNA sequence database using the BLASTN program (Altschul *et al.*, 1990). *E.*

coli was transformed by electroporation according to Dower et al. (Dower *et al.*, 1988), using a Bio-Rad GenePulser Xcell apparatus set at 25μF, 200 Ω, and 1.8 kV.

Real-time quantitative PCR assays for relative quantification of *attB* and *rph*. Real-time quantitative PCR assays were used to measure the percentages of cells in a culture that contained unoccupied MGI *attB* (a measure of the amount of excised circularized MGI) as described previously (Burrus *et al.*, 2003) with the following modifications. The amount of *attB* sites (3' end of *yicC*) was normalized to the amount of chromosomal DNA in each sample, which was determined by amplifying the 3' end of *rph*. The MGI-free strain *E. coli* CAG18439 was used as the calibrator strain which contains one copy of *attB* per chromosome. To induce expression of Xis from pXis or SetCD from pGG2B (Table 1) in complementation assays, cells were grown in LB supplemented with 0.02% arabinose prior to DNA extraction. When mitomycin C induction was needed, cells were grown overnight in LB supplemented with mitomycin C at the appropriate concentration prior to DNA extraction.

Primer pairs Q-PCR 1F/Q-PCR 1R and Q-PCR 2F/Q-PCR 2R were used to amplify the 173-bp *attB* and *rph* fragments, respectively (Table S3). The MasterCycler ep realplex⁴ sequence detection system (Eppendorf) was used to quantify the increase in fluorescence emission of SYBR Green I during PCR. The realplex software (version 1.5; Eppendorf) was used for data acquisition and analysis. Each 20-μl reaction mixture contained 10 μl of 2× SYBR Green PCR Master Mix (Quiagen), each primer at a concentration of 500 nM, and 8 ng of the DNA template. The PCR conditions were (i) 5 min at 95°C, (ii) 45 cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 60°C, (iii) 15 s at 95°C, (iv) 15 s at 60°C, (v) melting curve from 60°C to 95°C and (vi) 15 s at 95°C. Three reactions were performed for each sample. The mathematical model used for analysis of the data was described elsewhere (Burrus *et al.*, 2003).

Acknowledgments

This work was supported in part by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada. D.C. was supported by a fellowship from Cenci Bolognetti - Institut Pasteur Foundation, Italy and part of the work was funded by a grant from PRIN 2007 - Italy. V.B. holds a Canada Research Chair in molecular biology, impact and evolution of bacterial mobile elements and is a member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne-Le Bel. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

We are grateful to Dominic Poulin-Laprade and Nancy Perron for their technical assistance, and Alain Lavigueur and Geneviève Garriss for helpful comments on the manuscript. We thank Dean Rowe-Magnus (Sunnybrook Health Sciences Centre, Toronto, Canada), and Rita Colwell (University of Maryland, MD) for the kind gift of strains.

Supporting information

Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 Family Trigger The Excision and Drive the Mobilization of a New Class of *Vibrio* Genomic Islands

Aurélie Daccord¹, Daniela Ceccarelli^{1,2} and Vincent Burrus¹

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

²Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma Sapienza, Rome, Italy

Supplemental Figure S1.

Supplemental Table S1.

Supplemental Table S2.

Supplemental Table S3.

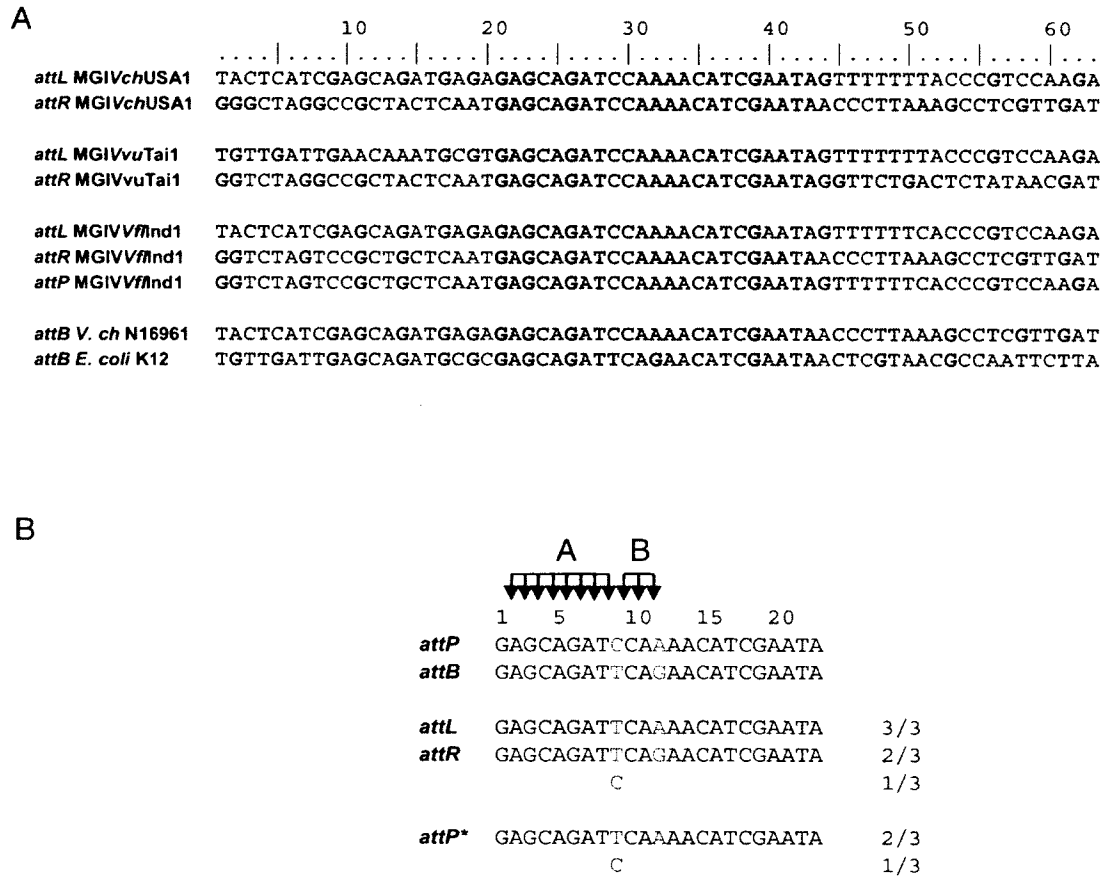


Fig. S1. Attachment sites of the MGIs. (A) *attL* and *attR* of MGIVchUSA1 and MGIVvuTai1. *attL*, *attR* and *attP* sites of MGIVfInd1 determined by partial amplification and sequencing. Integration site (*attB*) of MGIs in *E. coli* K12 MG1655 and potential *attB* in *V. cholerae* O1 El Tor strain N16961 (B) Potential cleavage sites in the core sequence of the *attP* attachment site of MGIVfInd1 and the *E. coli* integration target *attB*. Red letters show the differences between *attP*, *attB*, *attL* and *attR*. The sequences of *attL* and *attR* were determined in three independent *E. coli* exconjugants. *attP** represents the sequences obtained after excision of MGIVfInd1 in these exconjugants. All three *attL* sequences were identical, and two out of three *attR* and *attP** were identical. The nucleotides specific for *attP* are underlined. Sites of possible cleavage (A, B) during the strand exchange are indicated by arrows.

Table S1. MGII^VchUSA1 from *V. cholerae* RC385

Feature	Original name ^a	Product	Function/Domains
<i>rph</i>	rph	99% identical to ribonuclease PH [<i>V. cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961]	Rph, RNase PH [Translation, ribosomal structure and biogenesis].
<i>porfX</i>	NA	99% identical to VC0209 [<i>V. cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961] - pseudogene	Conserved protein, COG1561, Uncharacterized stress-induced protein
<i>int</i>	VCRC385_0168	99% identical to VV0277 [<i>V. vulnificus</i> YJ016]	INT_P4, Bacteriophage P4 integrase, P4-like integrases
<i>cds15</i>	NA	93% identical to VV0276 [<i>V. vulnificus</i> YJ016] and 50% to EexS [<i>V. cholerae</i> O139] (last 40 aa of EexS)	
<i>cds1</i>	NA	97% identical to MADE_4054 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	COG4680
<i>cds2</i>	NA	98% identical MADE_4055 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	COG5499, Predicted transcription regulator containing HTH domain
<i>cds3</i>	VCRC385_0167	95% identical to MADE_4056 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	COG4951, DEXDc, DEAD-like helicases superfamily, HELICc, Helicase superfamily C-terminal domain, SSL2, DNA or RNA helicases of superfamily II
<i>oriT</i>	NA	73% identical to <i>oriT</i> _{SX1} [<i>V. cholerae</i> MO10]	<i>oriT</i>
<i>cds4</i>	VCRC385_0166	86% identical to VV0270 [<i>V. vulnificus</i> YJ016]	
<i>cds16</i>	NA	23% identical to BGP_1950 [<i>Beggiatoa</i> sp. PS]	
<i>cds17</i>	NA	48% identical to Mlg_2307 [<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i> MLHE-1] and 38% to BGP_1949 [<i>Beggiatoa</i> sp. PS]	Possible transcriptional regulator with HTH domain, C/Cro family
<i>cds18</i>	VCRC385_0165	hypothetical protein	
<i>tnp</i>	NA	100% identical to IS1004 transposase [<i>V. cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961]	COG1943, Transposase and inactivated derivatives
<i>cds19</i>	VCRC385_0164	50% identical to PBPR0196 [<i>Photobacterium profundum</i> SS9]	COG1700, Uncharacterized conserved protein [Function unknown].
<i>cds20</i>	VCRC385_0163	80% identical to type III restriction enzyme, Res subunit Maqu_1910 [<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8]	COG3886, Predicted HKD family nuclease, SSL2, DNA or RNA helicases of superfamily II
<i>cds21</i>	VCRC385_0162	52% identical to hypothetical protein SUN_0707 [<i>Sulfurovum</i> sp. NBC37-1]	COG4190, Predicted transcriptional regulator
<i>cds8</i>	VCRC385_0161	95% identical to VV0263 [<i>V. vulnificus</i> YJ016]	COG5519, Superfamily II helicase and inactivated derivatives
<i>cds9</i>	NA	96% identical to VV0262 [<i>V. vulnificus</i> YJ016]	Phage_AlpA, Prophage CP4-57 regulatory protein (AlpA)
<i>cds10</i>	NA	79% identical to MADE_04066 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	Helix-turn-helix XRE-family like proteins, Transcriptional Regulator
<i>cds22</i>	VCRC385_0160	58% identical to MHA_0561 [<i>Mannheimia haemolytica</i> PHL213]	HipA protein
<i>cds12</i>	VCRC385_0159	92% identical to MADE_04068 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	
<i>cds13</i>	VCRC385_0158	92% identical to HipA domain protein MmwyII_4363 [<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1]	COG3550, HipA, HipA_C, HipA-like C-terminal domain.
<i>cds14</i>	NA	94% identical to MmwyII_4364 [<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1]	HTH_XRE, Helix-turn-helix XRE-family like proteins
<i>orfY</i>	NA	99% identical to conserved hypothetical protein VC_0208 [<i>V. cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961]	COG2862, Predicted membrane protein

^a NA : non annotated

Table S2. MGI_{wt}Tail from *V. vulnificus* YJ016

Feature	Original name ^a	Product	Function/Domains
<i>rph</i>	rph	100% identical to RNase PH [<i>V. vulnificus</i> CMCP6]	Rph, RNase PH [Translation, ribosomal structure and biogenesis].
<i>cds0278</i>	VV0278	100% identical to uncharacterized stress-induced protein VV1_0833 [<i>V. vulnificus</i> CMCP6]	Conserved protein, COG1561, Uncharacterized stress-induced protein
<i>int</i>	VV0277	99% identical to VCRC385_0168 [<i>V. cholerae</i> RC385]	INT_P4, Bacteriophage P4 integrase. P4-like integrases
<i>cds15</i>	VV0276	93% identical to hypothetical protein <i>cds15</i> [<i>V. cholerae</i> RC385] and 29% to EexS [<i>V. cholerae</i> O139]	
<i>cds23</i>	VV0274	63% identical to Sfri_1952 [<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400]	
<i>cds24</i>	VV0273	61% identical to PSEEN4650 [<i>Pseudomonas entomophila</i> L48] and 54% to Sfri_1951 [<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400]	HTH_XRE, Helix-turn-helix XRE-family like proteins, COG1476, Predicted transcriptional regulators, COG2856, Predicted Zn peptidase
<i>oriT</i>	NA	71% identical to <i>oriT_{SXT}</i> [<i>V. cholerae</i> MO10]	<i>oriT</i>
<i>cds4</i>	VV0270	86% identical to VCRC385_0166 [<i>V. cholerae</i> RC385]	
<i>cds5</i>	VV0269	96% identical to MADE_04059 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	COG1204, Superfamily II helicase, DEXDc, DEAD-like helicases superfamily, HELICc, Helicase superfamily C-terminal domain
<i>cds6</i>	VV0268	97% identical to MADE_04060 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	
<i>hsdS</i>	VV0267	29% identical to restriction endonuclease S subunit [<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255]	COG0732, HsdS, Restriction endonuclease S subunits, Methylase_S, Type I restriction modification DNA specificity domain
<i>hsdM</i>	VV0266	79% identical to MADE_04061 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	COG0286, HsdM, Type I restriction-modification system methyltransferase subunit, Methylase_S
<i>hsdR</i>	VV0265	98% identical to MADE_04062 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	COG4096, HsdR, Type I site-specific restriction-modification system, R (restriction) subunit and related helicases
<i>cds7</i>	VV0264	98% identical to MADE_04063 [<i>A. macleodii</i> 'Deep ecotype']	putative transcriptional regulator, Excisionase/Xis, DNA-binding
<i>cds8</i>	VV0263	95% identical to VCRC385_0161 [<i>V. cholerae</i> RC385]	COG5519, Superfamily II helicase and inactivated derivatives
<i>cds9</i>	VV0262	96% identical to <i>cds9</i> [<i>V. cholerae</i> RC385]	Phage_AlpA, Prophage CP4-57 regulatory protein (AlpA)
<i>cds25</i>	VV0261	97% identical to Sputn32_2895 [<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32]	COG1373, Predicted ATPase (AAA+ superfamily)
<i>cds0258</i>	VV0258	99% identical to permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily VV1_0834 [<i>V. vulnificus</i> CMCP6]	DUF6, Integral membrane protein DUF6

^a NA : non annotated

Table S3. Primers used in this study

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Use in the study
oriT-F	TCTAGACATCAAACCTAACCCAGTCAAATCGG	Amplification of <i>oriT</i> _{MGI}
oriT-R	TCTAGAACAACCTCCCCATGCCTTTACC	
AD3-F	TAGAACTATGGAGTAAACATGGGAAAACCTCA	Amplification of <i>int</i> _{MGIvuTai1}
AD3-V-R1	TTAGCGCCCTCCTGTGTGGTG	
AD5-A-R1	TTAGTCATCCAAGATGCTGCCTTT	Amplification of <i>cds8-cds9</i> in MGIV//Ind1
AD4-A-F	TAGCCGATTAGTACTGGCAAACCTCC	
AD8-WF	GGTTAGTAATCTTTAGCAGCTTGATTATATGGCCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Insertion of <i>aph</i> cassette into MGIV//Ind1
AD8-WR	TACCAGGTAATTTACGAGAAAAATAGTTAATTACTAATTCGGGGATCCGTCGACC	
AD9-WF	ATCGAGACGCCAAACGATCGTTTGCAATCTGGGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Deletion of <i>oriT</i> in MGIV//Ind1
AD9-WR	CCATACGCCAAACCACTATCCGTTTGGCTTTTGGGAATTCGGGGATCCGTCGACC	
AD10-WF	GTGGTGGGCAGCCATTATTGCCCCCTCCATTATTTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Deletion of <i>int</i> in MGIV//Ind1
AD10-WR	GCCACGGTTTGATGGGCAATACGGCGCTCTTCAAAATTCGGGGATCCGTCGACC	
Tra1WF2	TTGAACCTTCACACTATCGTGTGCGAGGTTCACTATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Deletion of <i>traI</i> in SXT
Tra1WR3	GCGTGAGCGGTAAACAGAACCGTTTCCCCCTCATCAAACCTATTCGGGGATCCGTCGACC	
attPAD-L1	TCGGCTTTGCTGTATGCAATA	Amplification of <i>attP</i> 1st round
attPAD-R1-AC	TCTGCCATAGCAACAGCAAT	Amplification of <i>attP</i> for MGIV _{chUSA1} and MGIV//Ind1; 1st round
attPAD-R1-V	GGACACCATAATGTCCATTTC	Amplification of <i>attP</i> for MGIV _{vuTai1} ; 1st round
attPAD-L2	GAGTTTTCCCATGTTTACTCCATA	Amplification of <i>attP</i> 2nd round
attPAD-R2-AC	GTGACAGCTTTGCCTGCTT	Amplification of <i>attP</i> for MGIV _{chUSA1} and MGIV//Ind1; 2nd round
attPAD-R2-V	CAGGCTGAGTGAGCTTTCTG	Amplification of <i>attP</i> for MGIV _{vuTai1} ; 2nd round
attL-F	AGCAGGAACTGGTTCTGTGG	Amplification of MGIV//Ind1 <i>attL</i> with attPAD-L2
attR-R	TGCAAAGAAAGTAAATCTGTAA	Amplification of MGIV//Ind1 <i>attR</i> with attPAD-R2-AC
intAD-F	ATCGGTGGTGGGCAGCCATTA	Amplification of <i>int</i> _{MGI}
intAD-R	AGCCACGGTTTGATGGGCAAT	
Q-PCR 1F	AAGTGACAAACTCCGCCATC	Amplification of <i>attB</i> in <i>E. coli</i>
Q-PCR 1R	GCACGCAAAACAGAATTGAA	
Q-PCR 2F	GAAAACGGCAAGCTGAAAAC	Amplification of <i>rph</i> in <i>E. coli</i>
Q-PCR 2R	GTCCCCGCACTTCAATGAT	
38-R	GCTGATCACGTTGCCGTTTTCG	Amplification of <i>oriT-cds4</i> with primer oriT-R in MGIV//Ind1

References

- Achard, A. and Leclercq, R. (2007) Characterization of a small mobilizable transposon, MTnSag1, in *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* 189: 4328-4331.
- Ahmed, A. M., Shinoda, S. and Shimamoto, T. (2005) A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiol Lett* 242: 241-247.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Beaber, J. W., Hochhut, B. and Waldor, M. K. (2002) Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 184: 4259-4269.
- Beaber, J. W., Hochhut, B. and Waldor, M. K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427: 72-74.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. and Hacker, J. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62: 606-614.
- Boyd, E. F., Almagro-Moreno, S. and Parent, M. A. (2009) Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends Microbiol* 17: 47-53.
- Burrus, V., Marrero, J. and Waldor, M. K. (2006) The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* 55: 173-183.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. and Guedon, G. (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46: 601-610.
- Burrus, V. and Waldor, M. K. (2003) Control of SXT integration and excision. *J Bacteriol* 185: 5045-5054.
- Burrus, V. and Waldor, M. K. (2004) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* 155: 376-386.

- Ceccarelli, D., Daccord, A., Rene, M. and Burrus, V. (2008) Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J Bacteriol* 190: 5328-5338.
- Chen, C. Y., Wu, K. M., Chang, Y. C., Chang, C. H., Tsai, H. C., Liao, T. L., et al. (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* 13: 2577-2587.
- Chun, J., Grim, C. J., Hasan, N. A., Lee, J. H., Choi, S. Y., Haley, B. J., et al. (2009) Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15442-15447.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2: 414-424.
- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- Faruque, S. M., Zhu, J., Asadulghani, Kamruzzaman, M. and Mekalanos, J. J. (2003) Examination of diverse toxin-coregulated pilus-positive *Vibrio cholerae* strains fails to demonstrate evidence for *Vibrio* pathogenicity island phage. *Infect Immun* 71: 2993-2999.
- Grandoso, G., Avila, P., Cayon, A., Hernando, M. A., Llosa, M. and de la Cruz, F. (2000) Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation. *J. Mol. Biol.* 295: 1163-1172.
- Hochhut, B., Marrero, J. and Waldor, M. K. (2000) Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* 182: 2043-2047.
- Hochhut, B. and Waldor, M. K. (1999) Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol Microbiol* 32: 99-110.
- Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., et al. (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol* 61: 584-595.

- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W. and Crook, D. W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 33: 376-393.
- Karaolis, D. K., Somara, S., Maneval, D. R., Jr., Johnson, J. A. and Kaper, J. B. (1999) A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature* 399: 375-379.
- Li, L. Y., Shoemaker, N. B., Wang, G. R., Cole, S. P., Hashimoto, M. K., Wang, J. and Salyers, A. A. (1995) The mobilization regions of two integrated *Bacteroides* elements, NBU1 and NBU2, have only a single mobilization protein and may be on a cassette. *J Bacteriol* 177: 3940-3945.
- Lin, T. L., Lee, C. Z., Hsieh, P. F., Tsai, S. F. and Wang, J. T. (2008) Characterization of integrative and conjugative element ICE*Kp1*-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J Bacteriol* 190: 515-526.
- Meyer, R. (2009) The R1162 Mob proteins can promote conjugative transfer from cryptic origins in the bacterial chromosome. *J Bacteriol* 191: 1574-1580.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G. and Hacker, J. (2004) Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* 186: 3086-3096.
- Moon, K., Shoemaker, N. B., Gardner, J. F. and Salyers, A. A. (2005) Regulation of excision genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J Bacteriol* 187: 5732-5741.
- Murphy, R. A. and Boyd, E. F. (2008) Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J Bacteriol* 190: 636-647.
- Nichols, B. P., Shafiq, O. and Meiners, V. (1998) Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of *Escherichia coli* strains used for genetic mapping and strain construction. *J Bacteriol* 180: 6408-6411.
- Novick, R. P. and Subedi, A. (2007) The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem Immunol Allergy* 93: 42-57.

- Paauw, A., Leverstein-van Hall, M. A., Verhoef, J. and Fluit, A. C. (2010) Evolution in quantum leaps: multiple combinatorial transfers of HPI and other genetic modules in *Enterobacteriaceae*. *PLoS One* 5: e8662.
- Quirke, A. M., Reen, F. J., Claesson, M. J. and Boyd, E. F. (2006) Genomic island identification in *Vibrio vulnificus* reveals significant genome plasticity in this human pathogen. *Bioinformatics* 22: 905-910.
- Rajanna, C., Wang, J., Zhang, D., Xu, Z., Ali, A., Hou, Y. M. and Karaolis, D. K. (2003) The vibrio pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholerae* forms precise extrachromosomal circular excision products. *J Bacteriol* 185: 6893-6901.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B. and Li, L. Y. (1995a) In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. *J Bacteriol* 177: 5727-5731.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., Stevens, A. M. and Li, L. Y. (1995b) Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* 59: 579-590.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) Lysing colonies and binding of DNA to filters. In: Molecular cloning: a laboratory manual. J. Sambrook & D. W. Russel (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1.135-131.137.
- Schubert, S., Dufke, S., Sorsa, J. and Heesemann, J. (2004) A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol Microbiol* 51: 837-848.
- Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K. and Brennan, R. G. (2009) Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323: 396-401.
- Scott, J. R. and Churchward, G. G. (1995) Conjugative transposition. *Annu Rev Microbiol* 49: 367-397.
- Seth-Smith, H. and Croucher, N. J. (2009) Genome watch: breaking the ICE. *Nat Rev Microbiol* 7: 328-329.

- Shoemaker, N. B., Wang, G. R. and Salyers, A. A. (2000) Multiple gene products and sequences required for excision of the mobilizable integrated *Bacteroides* element NBU1. *J Bacteriol* 182: 928-936.
- Singer, M., Baker, T. A., Schnitzler, G., Deischel, S. M., Goel, M., Dove, W., et al. (1989) A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 53: 1-24.
- Smith, C. J. and Parker, A. C. (1993) Identification of a circular intermediate in the transfer and transposition of Tn4555, a mobilizable transposon from *Bacteroides* spp. *J Bacteriol* 175: 2682-2691.
- Song, B., Wang, G. R., Shoemaker, N. B. and Salyers, A. A. (2009) An unexpected effect of tetracycline concentration: growth phase-associated excision of the *Bacteroides* mobilizable transposon NBU1. *J Bacteriol* 191: 1078-1082.
- Waldor, M. K., Tschape, H. and Mekalanos, J. J. (1996) A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* 178: 4157-4165.
- Wilson, G. G. and Murray, N. E. (1991) Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25: 585-627.
- Wozniak, R. A., Fouts, D. E., Spagnoletti, M., Colombo, M. M., Ceccarelli, D., Garriss, G., et al. (2009) Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet* 5: e1000786.
- Wozniak, R. A. and Waldor, M. K. (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 8: 552-563.

2.2. Régulation de l'intégration et de l'excision des MGI par les ICE de la famille SXT/R391

À la suite de l'étude présentée dans la partie précédente plusieurs questions subsistaient : comment le complexe SetCD active-t-il l'excision des MGI ? L'intégration des MGI nécessite-t-elle également une activation par SetCD ? Si oui, comment un MGI s'intègre-t-il dans une cellule dépourvue d'un ICE ? Afin de répondre à ces différentes questions, la partie qui suit est une étude de l'excision et l'intégration des MGI, ainsi que de la régulation de ces phénomènes.

Dans un premier temps, il a été vérifié que *Int* seule était suffisante pour catalyser l'intégration des MGI. Ensuite, il a été démontré que l'excision des MGI nécessite, en plus de l'intégrase, l'implication d'un facteur de direction de la recombinaison (RDF) et l'existence d'un RDF chez les MGI, nommé *RdfM*, a été mise en évidence. Les résultats de cette étude ont montré que le complexe SetCD agit comme activateur de la transcription à la fois de *int* et *rdfM*. Finalement, cette étude a permis de démontrer qu'à la différence de *rdfM*, dont le niveau de transcription est nul en absence de SetCD, *int* présente un niveau basal d'expression en absence de ce dernier. C'est ce niveau basal de transcription de l'intégrase qui permet à un MGI de s'intégrer dans le chromosome d'une cellule dépourvue d'un ICE SXT/R391, afin de ne pas être perdu.

Cette étude a donc permis de découvrir un nouvel RDF, et de comprendre plus en détail les mécanismes d'excision et d'intégration des MGI, en plus de mettre en avant un mécanisme élaboré de régulation de l'excision des MGI par les ICE de la famille SXT/R391. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans la partie suivante sous forme d'un article intitulé « *Dynamics of the SetCD-regulated integration and excision of Genomic Islands*

mobilized by Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family » (Daccord *et al.*, 2012b).

La contribution des auteurs dans cet article est la suivante : D. Poulin-Laprade a construit le mutant *SXT Δ setCD*. Sous ma supervision, M. Mursell a effectué la délétion de *cds4* dans *MGIV ϕ Ind1*, les expériences de mobilisation des mutants *MGIV ϕ Ind1 Δ cds4*, *MGIV ϕ Ind1 Δ rdfM* et il a testé l'excision du mutant *MGIV ϕ Ind1 Δ rdfM* par PCR quantitative. J'ai réalisé les délétions de *cds8* et *rdfM* dans *MGIV ϕ Ind1*, j'ai construit les plasmides pVB200, p8, p9 et p9-8 ainsi que toutes les souches présentées dans cette étude. J'ai réalisé les expériences de mobilisation et d'excision par PCR de pVB200, j'ai testé la mobilisation du mutant *MGIV ϕ Ind1 Δ cds8*. J'ai testé par PCR quantitative en temps réel l'expression de *yicC*, *int* et *rdfM* dans les différentes conditions présentées dans cette étude. L'ensemble du travail de recherche a été supervisé par le Pr. V. Burrus. Avec son aide, j'ai analysé l'ensemble des résultats et rédigé le manuscrit.

Dynamics of the SetCD-regulated integration and excision of Genomic Islands mobilized by Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family

Aurélie Daccord, Mathias Mursell, Dominic Poulin-Laprade and Vincent Burrus

Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Abstract

Mobilizable Genomic Islands (MGIs) are small genomic islands that are mobilizable by SXT/R391 Integrating and Conjugative Elements (ICEs) due to a similar origin of transfer. Their site-specific integration and excision is catalyzed by the integrase they encode but their conjugative transfer entirely depends upon the conjugative machinery of SXT/R391 ICEs. In this study we report the mechanisms that control the excision and integration processes of MGIs. We found that while the MGI-encoded integrase Int_{MGI} is sufficient to promote MGI's integration, efficient excision from the host's chromosome requires the combined action of Int_{MGI} and of a novel recombination directionality factor, RdfM . We determined that both genes are activated by SetCD, the main transcriptional activators of SXT/R391 ICEs. Although they share the same regulators, we found that unlike *rdfM*, *int_{MGI}* has a basal level of expression in the absence of SetCD. These findings explain how an MGI can integrate into the chromosome of a new host in the absence of a co-resident ICE and shed new light on the crosstalk that can occur between mobilizable and mobilizing elements that mobilize them, helping to understand part of the rules that dictate horizontal transfer mechanisms.

Introduction

Horizontal gene transfer plays a fundamental role in bacterial evolution (22, 24, 28, 32, 33). By transferring from a bacterial genome to another, mobile genetic elements allow bacteria to acquire new DNA fragments encoding a wide array of new functions (16, 26). Genomic islands (GIs) are mobile genetic elements that play a fundamental role in horizontal gene transfer (26). GIs are DNA segments (10-550 kb) that are often associated with tRNA genes and exhibit a G+C content usually different from the surrounding chromosome (16, 26). Based upon the functions they encode, GIs are also known as pathogenicity, symbiosis, metabolic, resistance or fitness islands (26).

Integrating conjugative elements (ICEs) are self-transmissible GIs found in many Gram-positive and Gram-negative bacteria (8, 11, 36-38, 42). ICEs confer a variety of functions to their host such as virulence factors, establishment of symbiosis, new metabolic traits, resistance to antibiotics and factors that enhance bacterial fitness (11). ICEs transfer via conjugation in a conjugative plasmid-like manner, and like many temperate bacteriophages they integrate into their host's chromosome along which they are replicated. The well-studied family of SXT/R391 ICEs includes more than 30 members that are found mostly in clinical and environmental *Vibrio* strains as well as in several other γ -proteobacterial species (7). SXT/R391 ICEs share a conserved set of 52 genes with nearly half of them encoding proteins necessary for conjugation, integration/excision and regulation (Fig. 1A) (41). They integrate by site-specific recombination into the 5' end of *prfC*, a non-essential gene involved in the termination of translation (25). While integration and excision of SXT/R391 ICEs is catalyzed by the site-specific tyrosine recombinase Int_{SXT}, their excision from the chromosome is facilitated by the recombination directionality factor (RDF) Xis (10). Conjugative transfer of SXT/R391 ICEs is initiated at a *cis*-acting locus called the origin of transfer (*oriT_{SXT}*) by the putative relaxase TraI and the auxiliary mobilization protein MobI that likely form together a nucleoprotein complex called the relaxosome (12). By analogy with conjugative plasmids, translocation of the ICE DNA through the

membranes of the donor and the recipient cell is thought to occur as a linear single-stranded DNA molecule covalently bound to TraI (4). Once in the recipient cell, the ICE DNA is recircularized and its complementary strand is synthesized prior to integration into the chromosome. Regulation of excision and transfer of SXT/R391 ICEs is controlled by *setR* which encodes a λ CI-like transcriptional repressor that represses the expression of *setCD* (4, 5). SetCD is a transcriptional activator complex that triggers the expression of all the genes involved in integration, excision, and conjugative transfer. SetR repression of *setCD* expression is alleviated by DNA damages (5), allowing SetCD to activate excision and transfer of the ICE.

Figure 1. Schematic representation of the core sets of conserved genes of SXT/R391 ICEs (A) and MGIs (B). Vertically hatched ORFs indicate the integration sites of the elements (*prfC* for SXT/R391 ICEs and *yicC* for MGIs). Black ORFs represent genes involved in site-specific excision and integration. Light grey ORFs represent genes encoding the conjugative transfer machinery. Dark grey ORFs correspond to genes involved in regulation (*setCDR*), and white ORFs represent genes of unknown function. *oriT*s are represented by horizontal grey arrowheads. Hotspots for insertion of variable DNA are indicated by black arrowheads pointing upward.

such GIs typically harbor functional or cryptic genes that encode site-specific recombinases (integrases) or transposases. Their mechanisms of transfer likely involve the participation of mobilizing self-transmissible elements, such as generalized transducing phages, conjugative plasmids or ICEs (6). We have recently identified in several genomes of *Vibrio* a new family of GIs that rely on a unique mechanism for gene transfer (13). These Mobilizable Genomic Islands (MGIs) have a size of less than 25 kb and can be mobilized at high frequency by SXT/R391 ICEs using a *cis*-acting *oriT* sequence that mimics *oriT*_{SXT}. MGIs integrate into the 3' end of *yicC*, a conserved gene encoding a putative stress induced protein (13). MGIs' integration is catalyzed by the site-specific recombinase Int_{MGI}, a distant relative of Int_{SXT}. Besides *int*_{MGI} and the *oriT*_{SXT}-like *oriT*_{MGI} sequence, all MGIs identified to date share only three conserved genes (Fig. 1B), none of which are predicted to encode components of a conjugative transfer machinery or an RDF. Interestingly, while MGIs' excision is independent of *int*_{SXT} and *xis*, it requires the presence of the ICE-encoded SetCD transcriptional activators (13).

In this study, we report the identification of the new RDF RdfM which is required for MGIs chromosomal excision. Like *int*_{MGI}, expression of *rdfM* is activated by SetCD. Comparison of the regulation of the integration/excision genes of SXT/R391 ICEs and of those of MGIs revealed that they are similarly regulated by SetCD in the donor cells; yet *int*_{MGI} is expressed independently of SetCD in the recipient cells, allowing MGIs to integrate into the chromosome of a cell lacking an SXT/R391 ICE. To the best of our knowledge, this is the first report of such an intimate interaction between two unrelated families of mobile genetic elements.

Materials and Methods

Bacterial strains and media

The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. The strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C in an orbital shaker/incubator and were maintained at -80°C in LB broth containing 15% (vol/vol) glycerol. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin (Ap), 100 µg/ml; kanamycin (Kn), 50 µg/ml; rifampicin (Rf), 50 µg/ml; spectinomycin (Sp), 50 µg/ml; sulfamethoxazole (Su), 160 µg/ml; tetracycline (Tc), 12 µg/ml; and trimethoprim (Tm), 32 µg/ml. When required, bacterial cultures were supplemented with 0.3mM DL- α,ϵ -diaminopimelic acid (DAP), 100 ng/ml mitomycin C, or 0.02% L-arabinose.

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant genotype or phenotype ^a	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
β2163	(F ⁻) RP4-2-Tc::Mu Δ <i>dapA</i> ::(<i>erm</i> - <i>pir</i>) (Kn ^r Em ^r)	(15)
MC4100 λ <i>pir</i>	F ⁻ <i>araD139</i> Δ(<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150</i> (Sm ^r) <i>relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i> λ <i>pir</i>	(19)
CAG18439	MG1655 <i>lacZU118 lacI42</i> ::Tn10 (Tc ^r)	(39)
VB112	MG1655 R ^f	(12)
AD57	CAG18439 <i>prfC</i> ::ICE <i>Vfl</i> Ind1 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1 (Tc ^r Su ^r Tm ^r)	(13)
AD63	CAG18439 <i>prfC</i> ::ICE <i>Vfl</i> Ind1 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1:: <i>aph</i> (Tc ^r Su ^r Tm ^r Kn ^r)	(13)
AD72	CAG18439 <i>prfC</i> ::SXT <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1:: <i>aph</i> (Tc ^r Su ^r Tm ^r Kn ^r)	(13)
AD81	CAG18439 <i>prfC</i> ::ICE <i>Vfl</i> Ind1 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1 Δ <i>int</i> :: <i>aad7</i> (Tc ^r Su ^r Tm ^r Sp ^r)	(13)
AD130	CAG18439 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1:: <i>aph</i> (Tc ^r Kn ^r)	This study
AD132	CAG18439 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1:: <i>aph</i> pGG2B (Tc ^r Kn ^r Ap ^r)	This study
AD133	CAG18439 <i>prfC</i> ::SXT Δ <i>setCD</i> <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1:: <i>aph</i> (Tc ^r Su ^r Tm ^r Kn ^r)	This study
AD167	CAG18439 <i>prfC</i> ::ICE <i>Vfl</i> Ind1 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1 Δ <i>cds9</i> :: <i>aph</i> (Tc ^r Su ^r Tm ^r Kn ^r)	This study
AD169	CAG18439 <i>prfC</i> ::ICE <i>Vfl</i> Ind1 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1 Δ <i>cds4</i> :: <i>aph</i> (Tc ^r Su ^r Tm ^r Kn ^r)	This study
AD192	CAG18439 <i>prfC</i> ::ICE <i>Vfl</i> Ind1 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1 Δ <i>cds8</i> :: <i>aph</i> (Tc ^r Su ^r Tm ^r Kn ^r)	This study
AD207	CAG18439 <i>prfC</i> ::R997 <i>yicC</i> ::MG1 <i>Vfl</i> Ind1:: <i>aph</i> (Tc ^r Ap ^r Kn ^r)	This study
AD208	CAG18439 pIntVvu (Tc ^r Ap ^r)	This study
AD210	β2163 pVB200 (Em ^r Cm ^r)	This study
AD217	CAG18439 <i>yicC</i> ::pVB200 pIntVvu (Tc ^r Cm ^r Ap ^r)	This study
AD232	β2163 pSW23T (Em ^r Cm ^r)	This study
Plasmids		
pIntVvu	pBAD-TOPO <i>int</i> _{MG1<i>Vvu</i>Tail} (Ap ^r)	(13)
pGG2B	pBAD30 <i>setCD</i> (Ap ^r)	G. Garriss
pSW23T	<i>ori</i> _{RP4} ; <i>ori</i> _{V_{R6K}} (Cm ^r)	(15)
pVB200	pSW23T <i>attP</i> _{MG1<i>Vfl</i>Ind1} (Cm ^r)	This study
p8	pBAD-TOPO <i>cds9</i> _{MG1<i>Vvu</i>Tail} (Ap ^r)	This study
p9	pBAD-TOPO <i>cds9</i> _{MG1<i>Vvu</i>Tail} (Ap ^r)	This study
p9-8	pBAD-TOPO <i>cds9-8</i> _{MG1<i>Vfl</i>Ind1} (Ap ^r)	This study
pKD13	PCR template for one-step chromosomal gene inactivation (Kn ^r)	(14)

^a Ap^r, ampicillin resistant; Cm^r, chloramphenicol resistant; Kn^r, kanamycin resistant; Nx^r, nalidixic acid resistant; R^f, rifampicin resistant; Sm^r, streptomycin resistant; Sp^r, spectinomycin resistant; Su^r, sulfamethoxazole resistant; Tc^r, tetracycline resistant; Tm^r, trimethoprim resistant

Plasmids and strain constructions

Plasmids and primers used in this study are described in Table 1 and 2, respectively. Plasmid pVB200 was constructed by sub-cloning of XbaI-flanked digestion product *attP*_{MGIV/Ind1} into the XbaI site of pSW23T. Product *attP*_{MGIV/Ind1} was amplified using genomic DNA of *V. fluvialis* H-08942 as a template and primer pair attPAD-L1/attPAD-R1-AC for the first round, attPAD-L2/attPAD-R2-AC for the second round and then cloned into vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Plasmid p9, p8 and p9-8 were constructed by cloning *cds9*_{MGIVvuTail}, *cds8*_{MGIVvuTail} or *cds9-8*_{MGIV/Ind1} into the TA cloning expression vector pBAD-TOPO (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. *cds9*_{MGIVvuTail}, *cds8*_{MGIVvuTail} and *cds9-8*_{MGIV/Ind1} were amplified by PCR from genomic DNA of *V. vulnificus* YJ016 or *V. fluvialis* H-08942 as a template using primers pairs AD4-V-F/AD4-R1, AD5-F/AD5-V-R1 and AD5-A-R1/AD4-A-F, respectively (Table 2).

All deletion mutants were constructed in *E. coli* AD57 using the one-step chromosomal gene inactivation technique (14). All mutations were designed to be non-polar. The $\Delta cds4$, $\Delta cds8$ and $\Delta cds9$ mutations were introduced in MGIV/Ind1 using primer pairs AD13-WF/AD13-WR, Gene8-WF/Gene8-WR, and AD11-WF/AD11-WR (Table 2) respectively, and pKD13 as the template. All deletion mutations were verified by PCR amplification using primers flanking the deletion.

Table 2. DNA sequences of the primers used in this study

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Use in the study
AD4-V-F	TAGCAGTGAGGAAGCAAACGATG	Amplification of <i>cds9</i> _{MGIVvuTail}
AD4-R1	TTATCCACGGCCATAAGCAGC	Amplification of <i>cds9</i> _{MGIVvuTail}
AD5-F	GCCGTGGATAAACCATCAGCA	Amplification of <i>cds8</i> _{MGIVvuTail}
AD5-V-R1	TTAGTCATCCAAAATACTGCCTTT	Amplification of <i>cds8</i> _{MGIVvuTail}
AD5-A-R1	TTAGTCATCCAAGATGCTGCCTTT	Amplification of <i>cds9-8</i> _{MGIVflInd1}
AD4-A-F	TAGCCGATTAGTACTGGCAAACCTCC	Amplification of <i>cds9-8</i> _{MGIVflInd1}
AD11-WF	CAGCCCACGGCAGCGCACCAATACGAATGGAAC GTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Deletion of <i>cds9</i> in MGIVflInd1
AD11-WR	ATGAACCCAACTACACAATCATCCACCACATCAA CAATTCGGGGATCCGTCGACC	Deletion of <i>cds9</i> in MGIVflInd1
AD13-WF	AGTGCTAACGATTGGGATAGAGAATGGATACAGC AGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Deletion of <i>cds4</i> in MGIVflInd1
AD13-WR	CAGCGCCCTGTGAGGGGTTACTCTTTTTCAGGC CTATTCGGGGATCCGTCGACC	Deletion of <i>cds4</i> in MGIVflInd1
attPAD-L1	TCGGCTTTGCTGTATGCAATA	Amplification of <i>attP</i> _{MGI} 1st round
attPAD-R1-AC	TCTGCCATAGCAACAGCAAT	Amplification of <i>attP</i> _{MGI} 1st round
attPAD-L2	GAGTTTTCCCATGTTTACTCCATA	Amplification of <i>attP</i> _{MGI} 2nd round
attPAD-R2-AC	GTGACAGCTTTGCCTGCTT	Amplification of <i>attP</i> _{MGI} 2nd round
Gene8-WF	TATGCCTAGCAACATGCCAAAATTACCAGCTGGT TTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Deletion of <i>cds8</i> in MGIVflInd1
Gene8-WR	TGACTTTGCGCTGTGGTTCGGTTGCCATCGGGGAT TAATTCGGGGATCCGTCGACC	Deletion of <i>cds8</i> in MGIVflInd1
Q-PCR-1F	AAGTGACAAACTCCGCCATC	Amplification of <i>attB</i> in <i>E. coli</i>
Q-PCR-1R	GCACGCAAAACAGAATTGAA	Amplification of <i>attB</i> in <i>E. coli</i>
Q-PCR-2F	GAAAACGGCAAGCTGAAAAC	Amplification of <i>rph</i> in <i>E. coli</i>
Q-PCR-2R	GTCCCCTGCACTTCAATGAT	Amplification of <i>rph</i> in <i>E. coli</i>
RTgene9-F b	TTATCCACGGCCATAAGCAG	Amplification of <i>cds9</i> _{MGIVflInd1}
RTgene9-R b	AGGTAAAGGCCAACTCAGGCTT	Amplification of <i>cds9</i> _{MGIVflInd1}
RTintVf-F	CCGTATCGGGTTTACACCAA	Amplification of <i>int</i> _{MGIVflInd1}
RTintVf-R	TTATCGCATGTGAAACAGC	Amplification of <i>int</i> _{MGIVflInd1}
RTrhoZcoli-F	GCTCGTCAGATGCAGGTAGG	Amplification of <i>rpoZ</i>
RTrhoZcoli-R	GCTTGTAATTCAGCGGCTTC	Amplification of <i>rpoZ</i>
RTyicC-F	GAGTGACGAAGGGGAAATCA	Amplification of <i>yicC</i>
RTyicC-R	GCTTTCAGTGCTGACCTTC	Amplification of <i>yicC</i>

Bacterial conjugation

Conjugation assays were used to transfer SXT, R997, MGIV/Ind1 or plasmids into *E. coli*. Mating assays were performed by mixing equal volumes of overnight cultures of donor and recipient strains. The cells were harvested by centrifugation and resuspended in a 1/20 volume of LB broth. Cell suspensions were poured onto LB agar plates and incubated at 37°C for 6h. The cells were then resuspended in 1 ml of LB medium, and serial dilutions were plated onto appropriate selective media to determine the number of donors, recipients, and exconjugants. Frequency of transfer was expressed as the number of exconjugant cells per recipient cells in the mating mixture at the time of plating. *E. coli* CAG18439, MC4100 Apir or VB112 were used as recipients in conjugation experiments (Table 1). To induce expression of Int_{MGI} from pIntVvu, SetCD from pGG2B, protein 8 from p8, protein 9 (RdfM) from p9, or proteins 9 and 8 from p9-8 (Table 1) in complementation assays, mating experiments were carried out on LB-agar plates supplemented with 0.02% L-arabinose.

Molecular biology techniques

All the enzymes were used according to manufacturer's instructions (New England Biolabs). Plasmid DNA was prepared with a QIAprep spin mini prep kit (Qiagen), and chromosomal DNA was prepared with a Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) as described in the manufacturer's instructions.

PCR assays were carried out in 50- μ l PCR mixtures with 1U of *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs). The PCR conditions were as follows: (i) 3 min at 94°C; (ii) 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at a suitable annealing temperature, and 30 s to 60 s at 72°C; and (iii) 5 min at 72°C. When needed, PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The purified PCR products or inserts of constructed plasmids were sequenced by Centre d'Innovation Génomique Québec (McGill University, Montréal, Québec, Canada). DNA sequences were compared with the GenBank DNA sequence database using the BLASTN program (3).

E. coli was transformed by electroporation in 1 mm-gap cuvettes according to Dower *et al.* (18), using a GenePulser Xcell apparatus (Bio-Rad) set at 25 μ F, 200 Ω , and 1.8 kV.

Real-time quantitative PCR assays for relative quantification of *attB* and *rph*

Real-time quantitative PCR assays were used to measure the percentages of cells in a culture that contained unoccupied MGI *attB* site (the 3' end of *yicC*) as described previously (13). Briefly, this corresponds to a comparison of the amount of excised circularized MGI relatively to the amount of chromosome copies deduced from the amplification of *rph*, a gene located immediately 5' of *yicC*. Primer pairs Q-PCR-1F/Q-PCR-1R and Q-PCR-2F/Q-PCR-2R were used for the amplification of *attB* and *rph*, respectively (Table 2).

RNA extraction and cDNA synthesis

Bacterial cultures were grown at 37°C to early exponential phase (OD₆₀₀=0.2). Cultures were split in two and induction was initiated by addition of 100 ng/ml mitomycin C or 0.02% L-arabinose. Two hours after induction, aliquots of bacterial cultures were directly mixed with RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen) and treated according to manufacturer's instructions. Bacterial RNA was isolated after treating the cells with lysosyme (Sigma), using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). In addition, RNA samples were treated with DNase (RNase-free DNase set, Qiagen) during purification and Turbo DNase (Ambion) after purification. RNA purity and concentration were evaluated with a ND-1000 NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific/NanoDrop Products). cDNA was prepared using the SuperScript II (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. 50 ng of random hexamers (Integrated DNA Technologies) and 1 μ g of total bacterial RNA were used in each reaction. After synthesis cDNA sample mixtures were purified with the PCR Purification Kit (Qiagen) and stored at -20°C.

Reverse transcription quantitative PCR

The MasterCycler ep realplex⁴ sequence detection system (Eppendorf) was used to quantify the increase in fluorescence emission of SYBR Green I during PCR. The realplex software (version 1.5; Eppendorf) was used for data acquisition and analysis. Each 25- μ l reaction mixture contained 12.5 μ l of 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 1 μ M of each primer, and 1 μ l of cDNA template. Primer pairs RTgene9-F b/RTgene9-R b, RTintVf-F/RTintVf-R, RTrpoZcoli-F/ RTrpoZcoli-R and RTyicC-F/RTyicC-R were used for the amplification of *cds9*_{MGIvJlnd1}, *int*_{MGIvJlnd1}, *rpoZ* and *yicC*, respectively (Table 2). The PCR conditions were (i) 5 min at 95°C, (ii) 45 cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 60°C, (iii) 15 s at 95°C, (iv) 15 s at 60°C, (v) melting curve from 60°C to 95°C and (vi) 15 s at 95°C. Three reactions were performed for each sample. For normalization, the *rpoZ* gene was used and results expressed as relative expression based on the $\Delta\Delta C_t$ calculation method. Experiments were carried out three times and combined.

Results

Int_{MGI} is the only MGI-encoded protein necessary for MGI integration

In a previous study we showed that Int_{MGI} is required for integration and excision of MGI Δ flnd1 (13). To examine whether Int_{MGI} is the sole MGI-encoded protein necessary to mediate MGI's integration into the 3' end of *yicC*, Int_{MGI}-mediated recombination between *attP_{MGI}* and *attB* at *yicC* was monitored using pVB200, a derivative of the mobilizable Cm^r suicide vector pSW23T harboring *attP_{MGI}* (Fig. 2A). Since pSW23T requires the product of *pir* to replicate, Cm^r exconjugants can be isolated after its conjugative transfer from a *pir*⁺ host to a *pir*⁻ host only if it has integrated into the chromosome.

As a negative control, we first mobilized empty pSW23T from a *mob*⁺ *pir*⁺ donor strain to CAG18439 or CAG18439 harboring pIntVvu (AD208), a plasmid expressing Int_{MGI} under the control of an arabinose inducible promoter. In both cases, the frequency of exconjugant formation was below 5×10⁻⁶ exconjugants/recipient, a value we established as our baseline for subsequent experiments (Fig. 2B). The few recovered exconjugants can be attributed to random integration of the plasmid into the recipient chromosome. As a positive control we also mobilized pVB200 from the same donor strain to a *pir*⁺ strain (MC4100 λ *pir*) to verify that the constructed plasmid remained mobilizable. We found that up to 39% of the *pir*⁺ recipient cells acquired and maintained the plasmid. We then mobilized pVB200 from the same donor strain to CAG18439 or AD208 (Fig. 2B). When Int_{MGI} was expressed in the *pir*⁻ recipient strain, the frequency of exconjugant formation was as high as the positive control, indicating that the plasmid was able to maintain by site-specific integration into the recipient's chromosome. Thus, we conclude that Int_{MGI} is the only MGI-encoded protein needed to mediate efficient integration of MGIs.

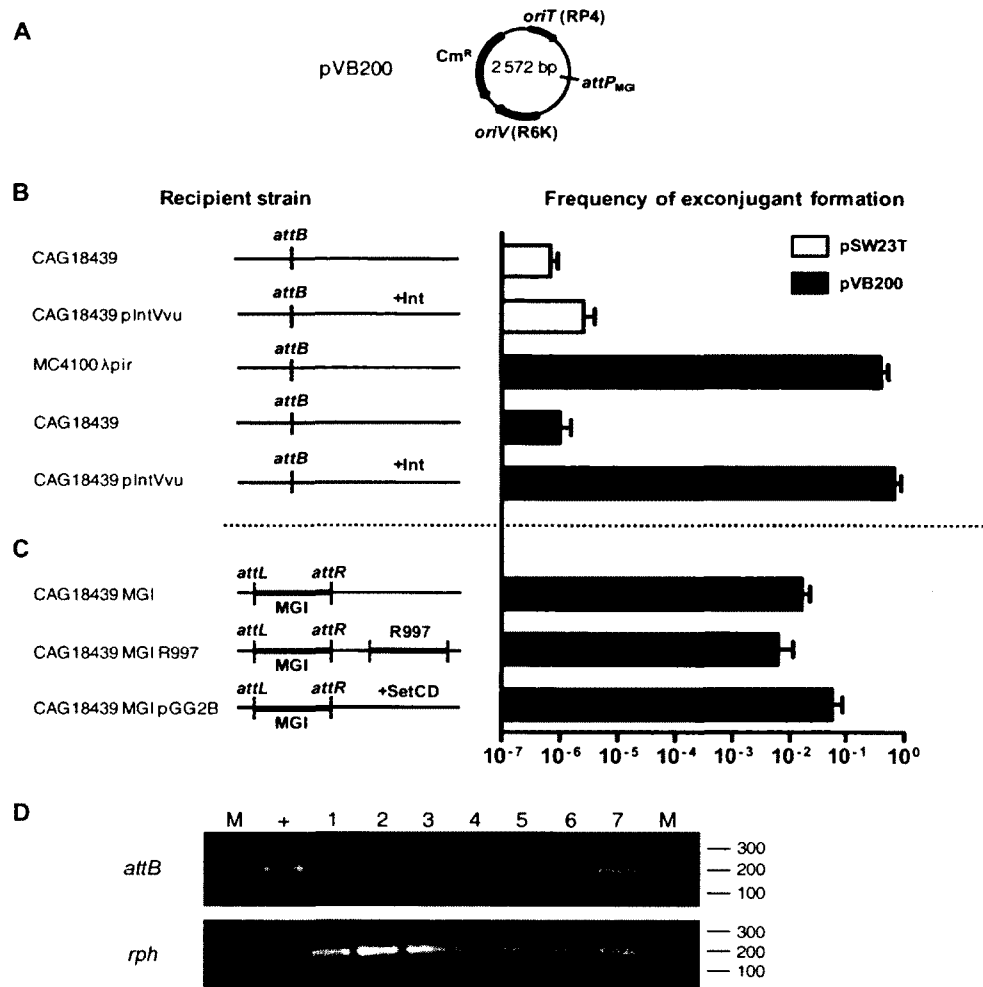


Figure 2. Genetic requirements for integration and excision of a replication-deficient plasmid containing the *attP* site of MGIV ϕ Ind1. A. Schematic map of pVB200. B and C. Mobilization assays of pSW23T and pVB200 performed to assess plasmid integration into the 3' end of *yicC* (*attB*). Conjugation assays were carried out using *E. coli* β 2163 (*pir*⁺) as a donor and MC4100 λ pir (*pir*⁺) or CAG18439 variants (*pir*⁻) as recipient strains. The genetic background of each recipient strain is indicated on the left side of the panels. R997 is an Ap^r-conferring ICE of the SXT/R391 family. To induce expression of Int_{MGI} from pIntVvu or SetCD from pGG2B, the conjugation assays were carried out on media supplemented with 0.02% arabinose. The frequency of exconjugant formation was obtained by dividing the number of exconjugants (Tc^r Cm^r CFU for CAG18439 or Sm^r Cm^r for

MC4100 λ pir) by the number of recipients (Tc^r or Sm^r CFU, respectively). The bars indicate the mean values and standard deviations obtained from three independent experiments. D. Analysis of excision of pVB200 integrated into *yicC* (*attB*). Ethidium bromide-stained 2% agarose gel of *attB* and *rph* fragments amplified by semi-quantitative PCR. Lanes: M, 2-Log molecular size marker; +, CAG18439; 1 and 2, CAG18439 *yicC*::pVB200 pIntVvu; 3, CAG18439 *yicC*::pVB200-MGIV ϕ Ind1; 4 and 5, CAG18439 *yicC*::pVB200-MGIV ϕ Ind1 *prfC*::R997; 6 and 7 CAG18439 *yicC*::pVB200-MGIV ϕ Ind1 pGG2B. Lanes 2 and 7, cultures were induced with 0.02% arabinose; Lane 5, culture was induced with 100 ng/ml mitomycin C.

MGI's integration does not require activation by SetCD

In our initial study of MGIs, we showed that the SXT/R391 ICE-encoded transcriptional activator SetCD is necessary for MGI's excision from the chromosome, suggesting that it is required to activate the expression of Int_{MGI} (13). Surprisingly, we also observed that colonies harboring an MGI but devoid of any ICE were also recovered at high frequency in exconjugant populations. This observation is consistent with the natural occurrence of environmental and clinical isolates (*V. cholerae* RC385 and *V. vulnificus* YJ016) having similar configurations (13) and suggests that while SetCD is necessary for excision, it is not required for *de novo* expression of Int_{MGI} in the recipient cells. To test this hypothesis, we mobilized pVB200 into CAG18439 harboring MGIV ϕ Ind1 alone (AD130) or along with either R997 (AD207), an Ap^r -conferring ICE of the SXT/R391 family, or pGG2B (AD132), a plasmid expressing SetCD under control of an arabinose inducible promoter (Fig. 2C). Interestingly, exconjugants formed at high frequency in the sole presence of MGIV ϕ Ind1 whereas the presence of R997 or expression of SetCD in the recipient cells did not significantly improve transfer and maintenance of pVB200 supporting the notion that SXT/R391 ICEs and SetCD are necessary for MGI's excision but not its integration.

Int_{MGI} alone does not promote efficient excision of MGIs

Next we examined whether Int_{MGI} alone was able to promote efficient excision of pVB200 integrated into *yicC*. We used a semi-quantitative PCR assay to detect unoccupied *attB* sites in the cell populations compared to *rph* as a reference target. The formation of *attB* site was tested in CAG18439 as a positive control, and in CAG18439 harboring *attB*::pVB200 along with pIntVvu (AD217), MGIV φ Ind1 (AD130), MGIV φ Ind1 and R997 (AD207), or MGIV φ Ind1 and pGG2B (AD132). We found that Int_{MGI} alone did not mediate efficient excision, even when overexpressed (Fig. 2D, lane 1-3). In fact, excision was only detectable in the presence of MGIV φ Ind1 either along with R997 or upon expression of SetCD from pGG2B (Fig. 2D, lane 4, 5 and 7). These results led us to suppose that an unidentified MGI-encoded factor likely helps Int_{MGI} to mediate efficient site-specific excision and that expression of this factor is likely activated by SetCD.

MGIs encode a putative RDF

Considering that Int_{MGI} is required but not sufficient to promote efficient excision, we looked at the genes conserved among sequenced MGIs to identify an RDF that could facilitate the Int_{MGI}-mediated excision of MGIs. RDFs control the directionality of tyrosine recombinase-mediated site-specific recombination events (30), and are usually small basic proteins (<100 amino acids) with or without a putative helix-turn-helix (HTH) DNA-binding motif. Besides *int_{MGI}*, only 3 genes are common to all MGIs identified and sequenced to date: *cds4* encodes a 214-amino acid protein of unknown function, *cds8* encodes a 580-amino acid putative helicase and *cds9* encodes an 80-amino acid predicted transcriptional regulator (Fig. 1B). Interestingly, the translation product of *cds9* shares 36% identity with Hef encoded by the High Pathogenicity Island (HPI) of *Yersinia pseudotuberculosis* and 29% identity with AlpA encoded by *E. coli* prophage CP4-57 (Fig. 3). Hef has been reported to act as a RDF (29) whereas AlpA has been reported to activate the expression of its cognate integrase gene (27). Given the size of the predicted translation

product of *cds9*, and its similarity with Hef, we considered it to be a good candidate for a putative RDF. Yet, given its similarity with the transcriptional regulator AlpA, we could not rule out at this point the possibility that the product of *cds9* could activate the expression of *int*_{MGI}.

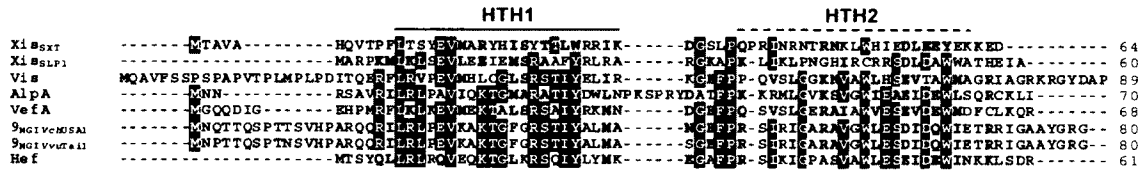


Figure 3. Sequence alignment of the translation products of *cds9*_{MGIVvuTail} and *cds9*_{MGIVchUSA1} with related RDFs. The primary sequences of RDFs encoded by two sequenced MGIs were aligned using MUSCLE with the transcriptional regulator AlpA from CP4-57 prophage (NP_417113) and the RDFs Xis encoded by ICEs of the SXT/R391 family (ACV96240), Hef of HPI from *Y. pseudotuberculosis* (CAB46594), VefA of VPI-2 from *V. cholera* N16961 (NP_231420), SLP1 of plasmid SLP1 from *S. coelicolor*, and Vis of the satellite bacteriophage P4 (NP_042041). Amino acid residues that are identical or similar (BLOSUM62 substitution matrix) in at least 60% of the sequences are indicated by a black or grey background, respectively. The solid bar indicates a helix-turn-helix (HTH) DNA-binding motif predicted in all proteins based on the Dodd-Egan method (17) (Dodd-Egan scores of 2.36 or higher), whereas the dashed bar highlights a secondary HTH motif exclusively predicted in RDFs encoded by MGIs (Dodd-Egan score of 3.07). The length of each protein is indicated in the right column.

Deletion of *cds9* dramatically affects MGI's excision and transfer

To assess whether one of the 3 MGI's conserved genes could act as an RDF we first constructed deletion mutants of each gene in *MGIV/Ind1*. We tested the ability of each

mutant to be mobilized by ICE*Vfl*Ind1. While deletions of *cds4* or *cds8* had virtually no impact, deletion of *cds9* led to a dramatic reduction of the MGI frequency of transfer (Fig. 4). Mobilization of MGI*Vfl*Ind1 Δ *cds9* could be partially restored when *cds9* was expressed *in trans* from an inducible promoter. Complementation with *cds8* did not restore MGI transfer, whereas complementation with *cds9-cds8* expressed from the same inducible promoter restored mobilization to the same level as *cds9* alone, ruling out the possible polar effects of the Δ *cds9* deletion on *cds8* that could have explained the partial complementation phenotype observed upon *cds9* overexpression.

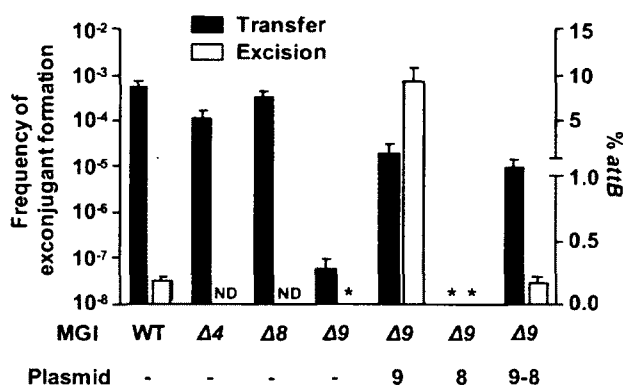


Figure 4. Genetic requirements for excision and transfer of MGI*Vfl*Ind1. Mobilization assay of MGI*Vfl*Ind1::aph or its Δ *cds4*, Δ *cds8* or Δ *cds9* mutants by ICE*Vfl*Ind1 were carried out using *E. coli* CAG18439 containing ICE*Vfl*Ind1 and MGI*Vfl*Ind1 mutants as donors. When indicated, the donor expressed *cds9*, 8 or 9 and 8 from p9, p8 or p9-8, respectively. *E. coli* VB112 (R^f) was used as the recipient strain. The frequency of exconjugant formation was calculated by dividing the number of exconjugants (R^f Kn^r CFU) by the number of donors (Tc^r CFU). Real-time quantitative PCR was used to determine the percentage of unoccupied *attB* sites resulting from the circularization of MGI*Vfl*Ind1 or of its Δ *cds9* mutant in *E. coli* CAG18439 harboring ICE*Vfl*Ind1, p9, p8 or p9-8. The bars indicate the mean values and standard deviations obtained from three independent experiments. ND, not determined. Asterisks indicate that the frequency of

exconjugant formation or the percentage of *attB* sites were below the limit of detection of the assays ($<1 \times 10^{-8}$ or 0.0004%, respectively).

To investigate whether the reduction of MGIV ϕ Ind1 transfer was a consequence of reduced or abolished excision caused by deletion of *cds9*, we conducted real-time quantitative PCR assays to measure the percentage of cells in a culture containing unoccupied *attB* sites and found that excision of MGIV ϕ Ind1 Δ *cds9* was undetectable (Fig. 4). On the opposite, excision of the same mutant was dramatically enhanced (50-fold wild-type level) when *cds9* was expressed *in trans*. Interestingly, the rate of excision of the mutant was restored to wild-type level when *cds9* and *cds8* were expressed together *in trans*, suggesting a possible regulatory activity of the protein encoded by *cds8*. These results indicate that the product of *cds9* plays an important role in MGI excision, either by acting as an RDF or by activating *int*_{MGI} expression, or both.

The product of *cds9* acts as an RDF, not as a transcriptional activator

AlpA was shown to activate the expression of the integrase gene of the cryptic prophage CP4-57 in *E. coli* (27). This ability prompted us to investigate whether the product of *cds9* could act as a transcriptional activator of *int*_{MGI}. Expression of *int*_{MGI} was measured by reverse transcription real-time quantitative PCR in the presence or absence of mitomycin C and in different genetic backgrounds, including cells devoid of ICE (AD130), cells containing an ICE and a wild-type (AD72) or Δ *cds9* (AD167) copy of MGIV ϕ Ind1, or cells containing both ICEV ϕ Ind1 and MGIV ϕ Ind1 and expressing *cds9* from an inducible promoter (Fig. 5A). We found that *int*_{MGI} expression was strongly stimulated by the addition of the DNA-damaging agent mitomycin C, but only in the presence of an SXT/R391 ICE. The absence of *cds9* had no effect on the mitomycin C-induced activation of *int*_{MGI} expression. Overexpression of *cds9* in the absence of mitomycin C induction led to a slight yet non-significant activation of *int*_{MGI} expression. This barely detectable level of activation is probably not dependent upon *cds9* expression, but rather the result of the

expression of SetCD in a subpopulation of cells inherently expressing the SOS response, as reported by McCool *et al.* (31). This phenomenon also explains the constitutive basal level of transfer of SXT/R391 ICE in the absence of DNA-damaging agents. These results combined with our previous observations on SetCD-mediated activation of MGI excision indicate that the product of *cds9* acts as a RDF rather than an activator of *int*_{MGI} expression. From now on, *cds9* will therefore be referred to as *rdfM* for “recombination directionality factor of MGI”.

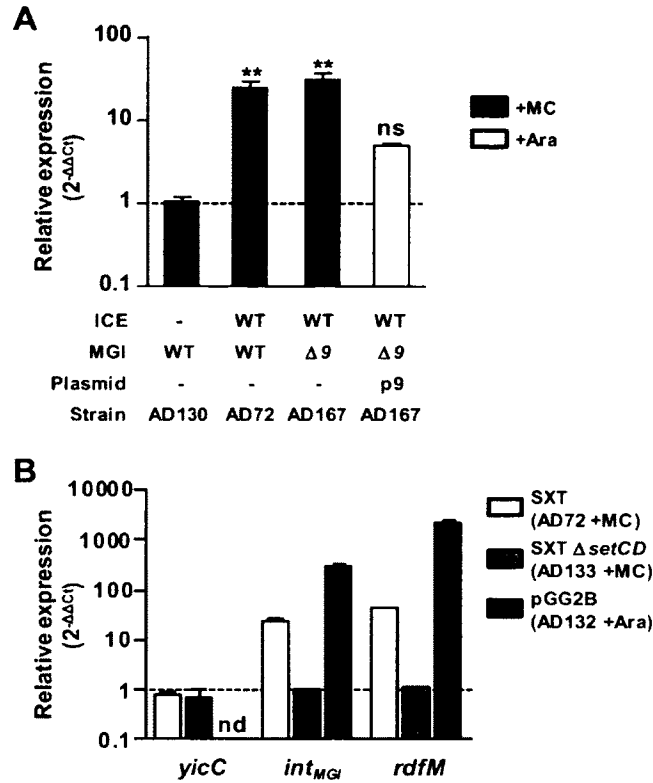


Figure 5. Regulation of the expression of integration and excision genes of MGIs and SXT/R391 ICEs. A. Impact of protein 9 on the expression of *int_{MGI}*. The expression of *int_{MGI}* was measured by quantitative PCR upon induction of the SOS response (+MC) in AD72, AD130 and AD167, or overexpression of *cds9* from p9 in AD167 p9 (+ara). One-way ANOVA with a Dunnett post-test was used to compare the means of relative expression of *int_{MGI}* against the strain devoid of ICE. The confidence interval for the comparisons was $P < 0.01$ (**). ns, non-significant. B. Impact of SetCD on *int_{MGI}* and *rdfM* expression. The expression of *yicC*, *int_{MGI}* and *rdfM* was measured upon induction of the SOS response (+MC) in AD72, and AD133, or upon overexpression of *setCD* from pGG2B (+ara) in AD132.

Expression of both *int*_{MGI} and *rdfM* is activated by SetCD

Given that SetCD activates MGI excision (13) and that DNA-damaging agents stimulate *int*_{MGI} expression, we hypothesized that SetCD acts as transcriptional activators of both *int*_{MGI} and *rdfM*. To verify this hypothesis, we measured the expression of *int*_{MGI} and *rdfM* in *E. coli* cells carrying MGIV/Ind1 and SXT (AD72), SXT Δ *setCD* (AD133) or expressing SetCD from pGG2B (AD132). We also measured the expression of *yicC* in the same cells since it is described in Genbank as a gene coding for a putative stress-induced protein and the relative position and orientation of *yicC* and *int*_{MGI} suggest that both genes may be co-transcribed. Induction was carried out with either mitomycin C (AD72 and AD133) or L-arabinose (AD132). First, we observed that neither SetCD nor mitomycin C modulates the expression of *yicC*, ruling out the possible expression of *int*_{MGI} from the promoter of *yicC* when the MGI is integrated into its 3' end (Fig. 5B). In contrast, in the presence of wild-type SXT, mitomycin C was found to stimulate the expression of both *int*_{MGI} and *rdfM* (24- and 44-fold increase, respectively), whereas it had no effect in the presence of the SXT Δ *setCD* mutant. This stimulation of expression is attributable to the increased expression of SetCD from SXT, as the expression of SetCD from pGG2B in a strain lacking SXT resulted in an increase of ~300 and ~2,000 fold of the transcript levels of *int*_{MGI} and *rdfM*, respectively.

***int*_{MGI} is constitutively expressed, allowing MGI integration in a strain devoid of an SXT/R391 ICE**

We previously reported that upon mating an *E. coli* donor strain harboring MGIV/Ind1 and ICEV/Ind1 ~98% of the isolated exconjugant colonies selected for the MGI were devoid of ICEV/Ind1, highlighting the independence of MGIs from ICEs for their integration into the chromosome (13). This result is supported by naturally occurring isolates containing MGIs but devoid of SXT/R391 ICEs (13). However, it contrasts with our aforementioned expression results indicating that SetCD activates the expression of *int*_{MGI}. To explain how

MGIs integrates into *yicC* in the absence of ICE-encoded SetCD, we had a closer look at *int_{MGI}* expression data in non-induced conditions which revealed that *int_{MGI}* has a low-level constitutive expression. In the presence of SXT (AD72), *int_{MGI}* and *rdfM* exhibit detectable $2^{-\Delta C_t}$ values of 0.041 and 0.01 relatively to *rpoZ*, respectively (Fig. 6). This level of expression is most likely a consequence of spontaneous induction of the SOS response (31). When the same experiment was carried out using SXT $\Delta setCD$ (AD133), *rdfM* expression was below the limit of detection whereas expression of *int_{MGI}* was only reduced by 36% (Fig. 6). This result, which is also supported by the high rate of exconjugant formation upon mobilization of pVB200 to a strain containing MGIV//Ind1 but lacking an ICE (Fig. 2C), indicates that *int_{MGI}* is constitutively expressed at a low level in the absence of SetCD. This basal level of expression is necessary and sufficient to promote integration of MGIs into the chromosome of a new host in the absence of a helper SXT/R391 ICE.

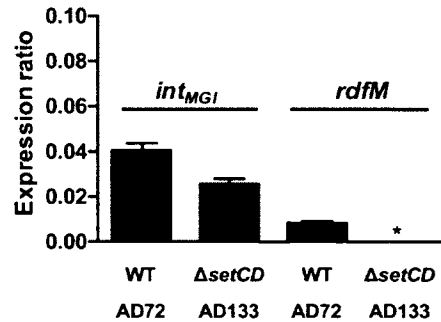
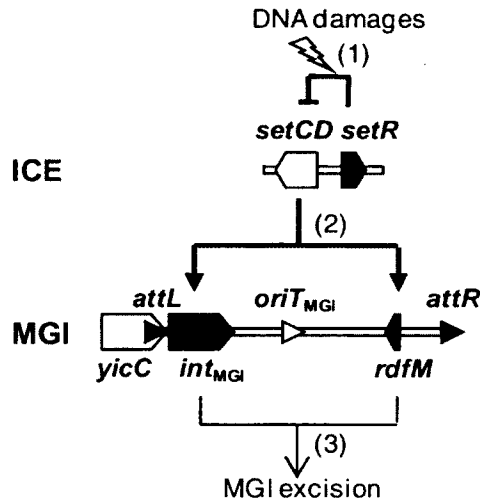


Figure 6. *int_{MGI}* has a basal level of expression in absence of SetCD. The expression of *int_{MGI}* was measured by quantitative PCR in AD72 and AD133. The graph shows differential gene expression values (ΔC_t) compared with the housekeeping gene *rpoZ*. Results are expressed as the mean of three independent biological replicates. The asterisk indicates that expression was below the detection limit.

Discussion

In this study we investigated the integration and excision dynamics of MGIs. We found that while the MGI-encoded integrase alone is sufficient to promote efficient MGI's integration into the chromosome, it also requires the MGI-encoded RDF *rdfM* to promote efficient MGI's excision. We found that both *int*_{MGI} and *rdfM* are activated by the SXT/R391 ICE-encoded transcriptional regulators SetCD. However, the expression of *int*_{MGI} does not strictly require SetCD whereas the expression of *rdfM* does. These findings help to establish how an MGI cannot excise from the chromosome of a cell devoid of an SXT/R391 ICE but can integrate into the chromosome of such a cell. Accordingly, we propose a model of the regulation pathways responsible for the excision and integration processes of MGIs in the donor and the recipient cells (Fig. 7).

A Donor cell



B Recipient cell

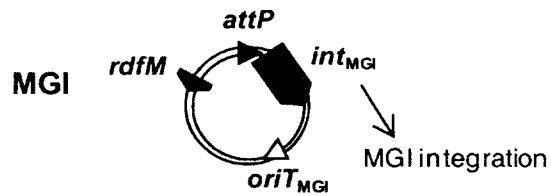


Figure 7. Integration and excision dynamics of MGIs in donor and recipient cells.

A. Excision from the donor cell chromosome. (1) SOS response is activated by DNA damages, alleviating the SetR-mediated repression of *setCD*. (2) The transcriptional activator SetCD activates the expression of *int_{MGI}* and *rdfM*. (3) *Int_{MGI}* and *RdfM* mediate the excision of the MGI. B. Integration into the recipient cell chromosome. *Int_{MGI}* is expressed at low level and allows MGI's integration regardless of the presence or absence of an SXT/R391 ICE.

Integration and excision are critical steps in the maintenance and dissemination of an integrative mobile genetic element, whether it is a temperate bacteriophage, an ICE or a mobile genomic island. Site-specific integration typically requires the action of a single mobile element-encoded site-specific recombinase and may require the help of host-encoded nucleoid proteins, such as the integration host factor (IHF) and the factor for inversion stimulation Fis (reviewed in references 20, 21). In contrast, the reverse recombination event, the site-specific excision usually requires an additional genetic element-encoded protein, the RDF, aka Xis/excisionase although it usually lacks a catalytic activity *per se*. RDF are usually small basic proteins that play architectural roles in the recombination events catalyzed by their cognate tyrosine or serine recombinase. Given their small size RDF-encoding genes can be difficult to identify and since a subset of RDFs harbor putative helix-turn-helix domains they are often annotated as putative transcriptional regulators.

Lewis and Hatfull divided RDFs in 11 subgroups based on sequence similarity (30). We showed here that RdfM belongs to the SLP1 subgroup of RDFs and as such has a putative conserved N-terminal HTH DNA binding motif (HTH1) (Fig. 3). Peculiarly, unlike other members of this subgroup, RdfM is predicted to contain a second C-terminal HTH DNA-binding motif (HTH2) (Fig. 3), the role of which remains to be determined as our results indicate that RdfM is not a transcriptional regulator of expression of *int*_{MGI}. This strongly contrasts with observations reported for AlpA of CP4-57, which activates the expression of *slpA*, the integrase gene of this cryptic prophage, and for which the role as an actual RDF remains unclear (27). Similarly, in addition to its RDF function, Vis of satellite prophage P4 has been shown to negatively regulate the expression of the P4 integrase by acting as an RNA-binding protein that post-transcriptionally regulates *int* expression (35). To date, all the RDFs belonging to the SLP1 subgroup have been found associated with P4-type integrases, as it is also the case for RdfM (2, 10, 29, 30).

Given their importance for transfer and stability of integrating mobile elements, excision and integration must be tightly regulated. In many temperate bacteriophages and ICEs, the genes coding for the integration and excision functions are organized as a functional module in which the gene encoding the RDF precedes the gene coding for the recombinase, and both genes are organized in an operon-like structure (1, 9, 23, 40). In contrast, the organization of the genes coding for the integration and excision functions of MGIs is atypical: *int*_{MGI} is located immediately adjacent to *attL* and *rdfM* is located on the opposite side, near the *attR* site (Fig. 1B). The integrase gene *intV2* (VC1758) and the RDF gene *vefA* (VC1809) of the *Vibrio* Pathogenicity Island-2 (VPI-2) are organized in a similar manner (2). This organization also resembles to the KplE1 prophage, in which the *attL* site overlaps with the promoter of the *intS* gene, and the gene coding for the RDF TorI is remotely located, near the *attR* site (34). Yet while the recombination function of MGIs and KplE1 seem to be organized alike, they are functionally unrelated. In KplE1, *intS* gene is tightly regulated by its own product as well as by the TorI protein (34). On the contrary, we showed that in MGIs, *rdfM* is not a transcriptional regulator of *int*_{MGI}. In fact, the uncoupled transcription of *rdfM* and *int*_{MGI} is likely a feature selected for by the opportunistic behavior of MGIs as they rely on the SXT/R391 ICE-encoded transcriptional regulator SetCD to excise from their host chromosome. Unlike MGI excision, MGI integration does not require activation by SetCD. Once in a recipient cell the MGI integrates site-specifically through the action of Int_{MGI} expressed at low level in the absence of SetCD. This process allows an MGI to establish itself in the host cell and be maintained in its progeny even in the absence of an SXT/R391 ICE.

Such regulatory mechanism might have been selected to prevent MGI loss due to unproductive excision in the absence of a potentially mobilizing ICE of the SXT/R391 family. As a consequence, like for these ICEs, MGI excision and transfer is triggered by any physical or chemical agents that will damage DNA and stimulate the bacterial SOS response, including UV-light irradiation or exposure to mitomycin C and antibiotics such

as ciprofloxacin (5, 13). Almagro-Moreno *et al* (2) showed that Vibrio Pathogenicity Island-2 (VPI-2) excise from chromosome I of *V. cholerae* N16961 after sublethal UV-light irradiation of the cells. Increased excision of VPI-2 was correlated to increased expression of *intV2* and *vefA*. However, since *V. cholerae* N16961 is devoid of SXT/R391 ICE, induction of VPI-2 excision cannot be controlled by the SetR/SetCD pathway, suggesting that it may instead rely on the SOS response regulon repressor *lexA*.

This study brings a new understanding of the dynamics of excision, transfer and integration of mobile genetic elements, giving a better insight on the rules that direct their mobility. We also show a novel interaction between two phylogenetically unrelated families of GIs and show how a small non self-transmissible GI with no conjugative functions, can take advantage of the conjugative machinery and regulatory pathways of a self-transmissible GI in order to transfer from one cell to another.

Acknowledgments

This work was supported by a Discovery Grant and Discovery Acceleration Supplement from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (V.B). D.P.L holds a Fonds de recherche du Québec doctoral fellowship. M.M. was supported by the Deutscher Akademischer Austausch Dienst RISE program. V.B. holds a Canada Research Chair in molecular bacterial genetics and is a member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne-Le Bel.

We are grateful to D. Mazel for kindly providing us with *E. coli* β 2163 and plasmid pSW23T. We would like to thank E. Bordeleau, G. Garriss, N. Carraro and A. Lavigueur for helpful comments and critical reading of the manuscript.

References

1. **Abremski K, Gottesman S.** 1981. Site-specific recombination Xis-independent excision of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* **153**:67-78.
2. **Almagro-Moreno S, Napolitano MG, Boyd EF.** 2010. Excision dynamics of *Vibrio* pathogenicity island-2 from *Vibrio cholerae*: role of a recombination directionality factor VefA. *BMC Microbiol* **10**:306.
3. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
4. **Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK.** 2002. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **184**:4259-4269.
5. **Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK.** 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**:72-74.
6. **Boyd EF, Almagro-Moreno S, Parent MA.** 2009. Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends Microbiol* **17**:47-53.
7. **Burrus V, Marrero J, Waldor MK.** 2006. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* **55**:173-183.
8. **Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guedon G.** 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* **46**:601-610.
9. **Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guedon G.** 2002. The ICE*StI* element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid* **48**:77-97.
10. **Burrus V, Waldor MK.** 2003. Control of SXT integration and excision. *J Bacteriol* **185**:5045-5054.
11. **Burrus V, Waldor MK.** 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* **155**:376-386.

12. **Ceccarelli D, Daccord A, Rene M, Burrus V.** 2008. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J Bacteriol* **190**:5328-5338.
13. **Daccord A, Ceccarelli D, Burrus V.** 2010. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Mol Microbiol* **78**:576-588.
14. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
15. **Demarre G, Guerout AM, Matsumoto-Mashimo C, Rowe-Magnus DA, Marliere P, Mazel D.** 2005. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalph) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res Microbiol* **156**:245-255.
16. **Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**:414-424.
17. **Dodd IB, Egan JB.** 1990. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res* **18**:5019-5026.
18. **Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**:6127-6145.
19. **Dziejman M, Mekalanos JJ.** 1994. Analysis of membrane protein interaction: ToxR can dimerize the amino terminus of phage lambda repressor. *Mol Microbiol* **13**:485-494.
20. **Finkel SE, Johnson RC.** 1992. The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol Microbiol* **6**:3257-3265.
21. **Friedman DI.** 1988. Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* **55**:545-554.
22. **Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A.** 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**:722-732.

23. **Ghinet MG, Bordeleau E, Beaudin J, Brzezinski R, Roy S, Burrus V.** 2011. Uncovering the prevalence and diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria. *PLoS One* **6**:e27846.
24. **Gogarten JP, Townsend JP.** 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**:679-687.
25. **Hochhut B, Waldor MK.** 1999. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol Microbiol* **32**:99-110.
26. **Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW.** 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**:376-393.
27. **Kirby JE, Trempey JE, Gottesman S.** 1994. Excision of a P4-like cryptic prophage leads to Alp protease expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**:2068-2081.
28. **Lawrence JG, Hendrickson H.** 2005. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. *Curr Opin Microbiol* **8**:572-578.
29. **Lesic B, Bach S, Ghigo JM, Dobrindt U, Hacker J, Carniel E.** 2004. Excision of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* requires the combined actions of its cognate integrase and Hef, a new recombination directionality factor. *Mol Microbiol* **52**:1337-1348.
30. **Lewis JA, Hatfull GF.** 2001. Control of directionality in integrase-mediated recombination: examination of recombination directionality factors (RDFs) including Xis and Cox proteins. *Nucleic Acids Res* **29**:2205-2216.
31. **McCool JD, Long E, Petrosino JF, Sandler HA, Rosenberg SM, Sandler SJ.** 2004. Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol* **53**:1343-1357.
32. **Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299-304.
33. **Ochman H, Lerat E, Daubin V.** 2005. Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102 Suppl 1**:6595-6599.

34. **Panis G, Duverger Y, Courvoisier-Dezord E, Champ S, Talla E, Ansaldi M.** 2010. Tight regulation of the *intS* gene of the KplE1 prophage: a new paradigm for integrase gene regulation. *PLoS Genet* **6**:e1001149.
35. **Piazzolla D, Cali S, Spoldi E, Forti F, Sala C, Magnoni F, Deho G, Ghisotti D.** 2006. Expression of phage P4 integrase is regulated negatively by both *Int* and *Vis*. *J Gen Virol* **87**:2423-2431.
36. **Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* **59**:579-590.
37. **Scott JR, Churchward GG.** 1995. Conjugative transposition. *Annu Rev Microbiol* **49**:367-397.
38. **Seth-Smith H, Croucher NJ.** 2009. Genome watch: breaking the ICE. *Nat Rev Microbiol* **7**:328-329.
39. **Singer M, Baker TA, Schnitzler G, Deischel SM, Goel M, Dove W, Jaacks KJ, Grossman AD, Erickson JW, Gross CA.** 1989. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **53**:1-24.
40. **Su YA, Clewell DB.** 1993. Characterization of the left 4 kb of conjugative transposon *Tn916*: determinants involved in excision. *Plasmid* **30**:234-250.
41. **Wozniak RA, Fouts DE, Spagnoletti M, Colombo MM, Ceccarelli D, Garriss G, Dery C, Burrus V, Waldor MK.** 2009. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet* **5**:e1000786.
42. **Wozniak RA, Waldor MK.** 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* **8**:552-563.

2.3. Diversité génétique des MGI, une famille largement répandue

Tout au long de mon projet doctoral j'ai détecté de nouveaux MGI dans des génomes bactériens nouvellement séquencés. Ces nouveaux MGI apportent chaque fois un peu plus de détails quand à la diversité génétique de cette famille d'éléments mobilisables et sur la diversité des hôtes bactériens des MGI. En effet, les MGI ne sont pas limités aux espèces des genres *Vibrio* et *Alteromonas* ; en revanche, jusqu'à présent ils sont toujours retrouvés dans des gammaproteobacteries et plus particulièrement dans des bactéries associés aux écosystèmes marins. En plus de ces éléments identifiés grâce à GenBank, des MGI ont également pu être identifiés dans les collections de souches de notre laboratoire et d'un laboratoire collaborateur : le laboratoire de Mauro M. Colombo (Università di Roma Sapienza, Rome, Italie). Six MGI ont ainsi été découverts dans des souches non séquencées de différentes espèces de *Vibrio*. Afin d'avoir la possibilité d'étudier ces éléments, un système de capture a été mis au point pour capturer les MGI dans un plasmide afin de les séquencer. Les MGI ainsi séquencés associés au reste des MGI identifiés nous ont permis d'effectuer une analyse comparative de cette famille d'éléments mobilisables contenant à présent seize membres, dont douze séquencés. Cette analyse a permis de montrer une évolution des MGI basée sur des événements de recombinaison entre ces éléments. Une analyse bioinformatique a également permis de révéler l'appartenance des MGI à une plus large famille d'îlots génomiques qui partagent le même site d'intégration et une intégrase similaire à celle des MGI. Ces îlots génomiques apparentés aux MGI ne possèdent toutefois pas les autres gènes conservés des MGI. Ils semblent tout de même être capables de s'exciser, cependant leur excision ne semble pas nécessiter une quelconque activation par SetCD.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie nous a permis de mieux comprendre les origines et la diversité des MGI. Cette étude est présentée dans l'article qui suit, intitulé « *Comparative Analysis of Mobilizable Genomic Islands* » (Daccord *et al.*, 2012a).

La contribution des auteurs dans cet article est la suivante : S. Rodrigue a construit les bibliothèques et envoyé les MGI au séquençage, il a aussi effectué l'assemblage des séquences après le séquençage. D. Ceccarelli a recherché de nouveaux MGI dans les souches de la collection du laboratoire de Mauro M. Colombo en Italie. Elle a également participé à la rédaction d'une partie du manuscrit. J'ai réalisé les constructions des souches et du plasmide pVB201 associés au système de capture. J'ai utilisé le système pour capturer les MGI, j'ai extrait les MGI capturés avant de les remettre à S. Rodrigue, puis j'ai annoté les MGI une fois le séquençage complété. J'ai également réalisé les expériences d'excision des MGI par PCR nichée. Avec l'aide du Pr. V. Burrus j'ai réalisé l'analyse phylogénétique des MGI. L'ensemble du travail de recherche a été supervisé par le Pr. V. Burrus. Avec son aide, j'ai analysé l'ensemble des résultats et rédigé le manuscrit.

Comparative Analysis of Mobilizable Genomic Islands

Aurélié Daccord, Daniela Ceccarelli, Sébastien Rodrigue and Vincent Burrus

Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Abstract

Mobilizable genomic islands (MGIs) are small genomic islands of less than 35 kbp containing an integrase gene and a sequence that resembles the origin of transfer (*oriT*) of an Integrating Conjugative Element (ICE). MGIs have been shown to site-specifically integrate and excise from the chromosome of bacterial hosts, and hijack the conjugative machinery of a co-resident ICE to disseminate. To date, MGIs have been described in three strains belonging to three different *Vibrio* species. In this study, we report the discovery of eleven additional putative MGIs found in various species of *Vibrio*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Methylophaga*. We designed an MGI capture system that allowed us to relocate chromosomal MGIs onto a low-copy plasmid and facilitate their isolation and sequencing. Comparative genomics and phylogenetic analyses of these mobile genetic elements revealed their mosaic structure and their evolution through recombination and acquisition of exogenous DNA. MGIs were found to belong to a larger family of genomic islands (GIs) sharing a similar integrase gene and often integrated into the same integration site, yet exhibiting a different mechanism of regulation of excision and mobilization. We found that MGIs can excise only when an ICE of the SXT/R391 family is co-resident in the same cell while GIs still excise regardless.

Introduction

The SXT/R391 family of Integrating Conjugative Elements (ICEs) is a well-studied family of self-transmissible mobile genetic elements responsible for the dissemination of antibiotic resistance genes in clinical and environmental *Vibrios* and related gammaproteobacteria such as *Providencia rettgeri*, *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium damsela* (1-3). This family currently includes more than 30 members (4, 5) that share a common set of 52 conserved genes and the same chromosomal integration site, the 5' end of *prfC* which encodes peptide chain release factor 3. Each ICE of this family also contains variable DNA inserted in specific positions of the backbone (hot spots) and encoding various functions such as resistance to antibiotics or heavy metals.

Mobilizable genomic islands (MGIs) are small genomic islands (approximately 20 kpb) that rely on an unusual mechanism to transfer at high frequency from one cell to another (6). MGIs carry a conserved sequence that mimics the origin of transfer (*oriT*) of SXT/R391 ICEs, and utilize both the DNA processing and conjugative apparatus encoded by these ICEs to transfer to a new recipient cell. To date three MGIs have been described, each in a different *Vibrio* species: MGIV_{vu}Tai1 and MGIV_{fl}Ind1 in the clinical isolates *Vibrio vulnificus* YJ016 and *Vibrio fluvialis* H-08942, respectively, and MGIV_{ch}USA1 in the environmental isolate *Vibrio cholerae* RC385 (Table 1). All three MGIs share the same integration site, i.e. the 3' end of a gene encoding a putative stress induced protein named *yicC* in *Escherichia coli* (6). Besides the *oriT*_{SXT}-like sequence, the three MGIs also share four conserved genes: *int*_{MGI}, which encodes a tyrosine recombinase responsible for the MGI's excision and integration, *rdfM*, which encodes a recombination directionality factor necessary for excision and two putative genes of unknown function (*cds4* and *cds8*) (6, 7). MGIV_{ch}USA1 encodes two different putative toxin/antitoxin systems related to the HipA/B system of *E. coli*, a system that has been shown to promote bacterial multidrug tolerance (8). These toxin/antitoxin systems could also improve the stability of this MGIV_{ch}USA1 by acting as post-segregational killing systems (9). MGIV_{vu}Tai1 encodes a

type I restriction modification system that could protect its host from bacteriophage infection (10). Potential selective advantages conferred by MGIV ϕ Ind1 are unknown as its whole sequence is not available to date (6).

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant genotype or phenotype ^a	Reference
<i>Escherichia coli</i> K12		
CAG18439	MG1655 <i>lacZU118 lacI42::Tn10</i> (Tc ^r)	(43)
AD157	CAG18439 Δ <i>yicC</i> (Tc ^R)	This study
AD171	MG1655 Δ <i>yicC</i> <i>prfC</i> ::R997 pVB201 (Ap ^R , Cm ^R)	This study
AD175	MG1655 Δ <i>yicC</i> Δ <i>dapA</i> ::(<i>erm-pir</i>) <i>prfC</i> ::R997 pVB201 (Em ^R , Ap ^R , Cm ^R)	This study
β 2163	(F-) RP4-2-Tc::Mu Δ <i>dapA</i> ::(<i>erm-pir</i>) (Kn ^R , Em ^R)	(44)
<i>Alteromonas macleodii</i>		
'Deep Ecotype'	MGLAmaMed1, Environmental, 2002, Mediterranean sea	(45)
<i>Shewanella</i> sp.		
W3-18-1	ICESpuPO1 GISpPO1, Environmental, Pacific Ocean	(46)
<i>Vibrio cholerae</i>		
N16961	O1 El Tor	(47)
RC385	MGIVchUSA1, O135, Environmental, 2005, USA	(48)
3AM0Z	ICEVchMoz2 MGIVchMoz2, Environmental, 2002, Mozambique	(21)
7AM0Z	ICEVchMoz3 MGIVchMoz3, Environmental, 2002, Mozambique	(21)
8AM0Z	ICEVchMoz4 MGIVchMoz4, Environmental, 2002, Mozambique	(21)
16AM0Z	ICEVchMoz6 MGIVchMoz6, Environmental, 2003, Mozambique	(21)
<i>Vibrio fluvialis</i>		
H-08942	ICEV ϕ Ind1 MGIV ϕ Ind1, Clinical, 2002, India	(20)
<i>Vibrio mimicus</i>		
VM573	GIVmiUSA1, Clinical, 1990, USA	(49)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
21AM0Z	ICEVpaMoz1 MGIVpaMoz1, Environmental, 2002, Mozambique	(21)
<i>Vibrio vulnificus</i>		
YJ016	MGIVvuTai1, Clinical, 1992, Taiwan	(50)
Plasmids		
pBeloBac11	(Cm ^r)	(19)
pVB201	pBeloBac11::attB _{1chN16961} (Cm ^r)	This study
pVI36	<i>aad7</i> (Sp ^r) PCR template for one-step chromosomal gene inactivation	(23)

Unlike the vast majority of genomic islands (GIs) for which the mechanisms of dissemination remain unclear, the regulation of MGI's excision, transfer and integration has recently been elucidated (6, 7). In the absence of an SXT/R391 ICE, an MGI integrated into the chromosome of its host does not excise. If a co-resident SXT/R391 ICE is present, the ICE-encoded transcriptional activator SetCD triggers the expression of both *rdjM* and *int*_{MGI} to promote MGI site-specific excision (7). Once the MGI is excised as a circular covalently-closed molecule, *oriT*_{MGI} is recognized by the ICE-encoded relaxase to translocate the MGI into the recipient cell as a single-stranded DNA molecule through the mating bridge encoded by the ICE (6). Mobilization of the MGI to the recipient cell is independent of the co-transfer of the ICE (6, 7). Furthermore, MGI integration into the 3' end of *yicC* has been shown to be mediated by *Int*_{MGI}, which is expressed at low-level in a SetCD-independent manner in the recipient cell (7). Besides promoting genomic plasticity through their own mobilization, MGIs can also mobilize chromosomal DNA located 5' of their integration site. Chromosomal DNA mobilization is driven by the SXT/R391 ICE through the recognition of the *oriT*_{SXT}-like sequence on the MGI. This process can lead to the mobilization of at least 1 Mbp of chromosomal DNA (6).

Here we report the characterization of eleven additional putative MGIs in the genome of various gammaproteobacteria. Comparative genomics and phylogenetic analyses of these elements revealed their mosaic structure and their evolution through recombination and acquisition of exogenous DNA. MGIs were found to belong to a larger family of GIs sharing a similar integrase gene and often integrated into the same integration site, yet exhibiting a different mechanism of regulation of excision and mobilization.

Materials and Methods

Bacterial strains. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. The strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C in an orbital shaker/incubator and were maintained at -80°C in LB broth containing 15% (vol/vol) glycerol. *Alteromonas macleodii* ‘Deep Ecotype’ was grown in Marine Broth (Difco, BD). Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin (Ap), 100 µg/ml; chloramphenicol (Cm), 20 µg/ml; erythromycin (Em), 200 µg/ml; kanamycin (Kn), 50 µg/ml; spectinomycin (Sp), 50 µg/ml; tetracycline (Tc), 12 µg/ml.

Bacterial conjugation. Conjugation assays were used to transfer MGIV//Ind1 and MGIV*ch*Moz6 into AD175 (intermediate) and AD157 (recipient). Mating assays were carried out by mixing equal volumes of 7-h grown cultures of donor, intermediate and recipient strains. The cells were harvested by centrifugation for 5min at 5,500g and resuspended in a 1/20 volume of LB broth. Cell suspensions were poured onto LB agar plates and incubated at 37°C for 15h. The cells were then resuspended in 1 ml of LB medium, and serial dilutions were plated onto appropriate selective media to determine the number of donors, intermediate, recipients, and exconjugants. Exconjugants were purified and tested by PCR for the presence of the MGI.

Construction of plasmids and strains. The plasmids used in this study are described in Table 1. Plasmid pVB201 was constructed by cloning the MGI *attB* site from *V. cholerae* N16961 (*attB*_{VchN16961}) into the HindIII restriction site of pBeloBac11 (New England Biolabs). *attB*_{VchN16961} was amplified using the primer pair attB-F/attB-R (Table S1) and genomic DNA of *V. cholerae* N16961 as a template. Deletion of *yicC* in AD175 and AD157 was constructed by using the one-step chromosomal gene inactivation technique (11) using primer pair attB-WF/attB-WR (Table S1) and pVI36 as a template. Deletion of *dapA* was introduced in MG1655 by P1vir transduction of $\Delta dapA::(erm-pir)$ from *E. coli* β 2163 into *E. coli* AD171 as the recipient.

Molecular biology techniques. All the enzymes were used according to manufacturer's instructions (New England Biolabs). Plasmid DNA was prepared with a QIAprep Spin Miniprep or QIAfilter Plasmid Midi kit (Qiagen), and chromosomal DNA was prepared with a Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) as described in the manufacturer's instructions. Colony blotting was performed as previously described (6). PCR assays were carried out in 50- μ l PCR mixtures with 1U of *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs). The PCR conditions were as follows: (i) 3 min at 94°C; (ii) 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at a suitable annealing temperature, and 30 s to 60 s at 72°C; and (iii) 5 min at 72°C. When needed, PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. *E. coli* was transformed by electroporation according to Dower et al. (12), using a Bio-Rad GenePulser Xcell apparatus set at 25 μ F, 200 Ω , and 1.8 kV.

Nested PCR experiments on MGIs were performed as previously described (6). For the related GIs in *Shewanella* sp. W3-18-1 and *Vibrio mimicus* VM573, the same method was used with primers attPSpu-L1/attPSpu-R1, attPSpu-L2/attPSpu-R2 and attPVmi-L1/attPVmi-R1, attPVmi-L2/attPVmi-R2, respectively (Table S1).

Sequencing. MGIV*fl*Ind1 (Genbank Acc. Numb KC117176) and MGIV*ch*Moz6 (Genbank Acc. Numb. KC117175) were captured in pVB201, and the resulting plasmids were grown in *E. coli*. The DNA was extracted, and Illumina sequencing libraries were prepared as described (13) with the following modifications. The DNA was sheared with 1 unit of dsDNA shearase (ZymoResearch) at 37°C for 60 minutes, and purified using AMPureXP beads (sheared DNA to beads v/v ratio of 0.7) before proceeding to Illumina adapter ligation. DNA inserts had an average size of approximately 500bp. Libraries were barcoded and mixed with additional samples and sequenced on a HiSeq2000 instrument at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre. Paired-end reads of 100bp were generated and demultiplexed using Novobarcoder. MGIs were assembled using the Roche

gsAssembler v2.5 software. Gene detection and annotations were carried out using Blast software (14) and databases available from NCBI.

Bioinformatics analyses. Phylogenetic trees were generated using the PhyML v3.0 program (15) with the LG substitution model for protein sequences based tree and HKY85 substitution model for DNA sequences based tree. Tree topologies were optimized by PhyML using both the NNI (Nearest Neighbor Interchange) and SPR (Subtree Pruning and Regrafting) methods and the starting tree was estimated using BioNJ. Branch support of the phylogenies was estimated using nonparametric bootstrap (100 replicates). Phylogenetic analyses were computed from reliable amino acid or DNA alignments built by MUSCLE multiple sequence alignment software (16). Removal of poorly aligned regions from amino acid alignments was carried out by trimAl v1.2 software using the automated heuristic approach (17) prior to phylogenetic analyses. Phylogenetic trees were viewed using iTOL v2 (18).

Results

Five environmental *Vibrio* strains from Mozambique harbor putative MGIs

To estimate the prevalence of MGIs in *Vibrios* and other bacterial species, we screened by Southern blot hybridization a large collection of *V. cholerae* (O1 and non O1, non O139), *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *Vibrio metschnikovii*, *P. rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Providencia alcalifaciens*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas hydrophila*. Among 149 strains analyzed were clinical and environmental strains isolated between 1992 and 2004 in Italy, Vietnam, India, Bangladesh, Taiwan, Mexico, Angola, Mozambique, Rwanda, Somalia, Swaziland and Zimbabwe. Using *int*_{MGI} as a probe, five additional related MGIs were identified in Mozambican environmental strains of *V. parahaemolyticus* (21AM0Z) and *V. cholerae* (3AM0Z, 7AM0Z, 8AM0Z and 16AM0Z) (Table 2).

Based on PCR amplification and DNA sequencing, we found that these strains also contain the *oriT*_{SXT}-like sequence, *cds4*, *cds8* and *rdfM*, and are integrated into the 3' end of the same orthologue of *E. coli*'s *yicC*. These results suggest that these strains harbor MGI-like elements. Interestingly, all of them also contain an ICE of the SXT/R391 family (Table 1) suggesting that the putative MGIs could be mobilized at relatively high frequency.

Table 2. Properties of MGI-like elements

e	Host strain	Site and year of isolation	% identity to <i>intMGI::USA1</i>	SXT/R391 ICE	Genbank accession number	Reference
<i>VchUSA1</i>	<i>V. cholerae</i> RC385	Environmental, 2005, USA	100	-	ZP_06943583.1	(48)
<i>VvuTai1</i>	<i>V. vulnificus</i> YJ016	Clinical, 1992, Taiwan	98.8	-	NP_933070.1	(50)
<i>PspArc1</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20311	Environmental, 2009, Arctic sea	98.3	-	ZP_09227437.1	(51)
<i>VflInd1</i>	<i>V. fluvialis</i> H-08942	Clinical, 2002, India	97.4	ICE <i>VflInd1</i>	KC117176	(20)
<i>VchHai4</i>	<i>V. cholerae</i> HE45	Gray Water, External Clinic, 2010, Haiti	96.9	-	EJH66094.1	(22)
<i>hHai3</i>	<i>V. cholerae</i> HE-09	Environmental, 2010, Haiti	96.9	-	EGS63339.1	(22)
<i>AmaMed1</i>	<i>A. macleodii</i> 'Deep Ecotype'	Environmental, 2002, Mediterranean sea	90.9	-	YP_004427371.1	(45)
<i>VchMoz6</i>	<i>V. cholerae</i> 16AMOZ	Environmental, 2003, Mozambique	88.5	ICE <i>VchMoz6</i>	KC117175	(21)
<i>VchHai1</i>	<i>V. cholerae</i> HE39	Environmental, 2010, Haiti	87.8	-	EGR03948.1	(22)
<i>AspKor1</i>	<i>Alteromonas</i> sp. SN2	Environmental, 2007, Korea	83.5	-	YP_004469681.1	(52)
<i>MamKor1</i>	<i>Methylophaga aminisulfidivorans</i> MP	Environmental, 2007, Korea	83.1	-	ZP_08537443.1	(53)
<i>VchHai5</i>	<i>V. cholerae</i> HC-43B1	Clinical, 2010, Haiti	82.3	-	ALDP00000000.1	(22)
<i>VchHai2</i>	<i>V. cholerae</i> HE48	Environmental, 2010, Haiti	76.3	-	EGR10536.1	(22)
<i>VchMoz2</i>	<i>V. cholerae</i> 3AMOZ	Environmental, 2002, Mozambique	-	ICE <i>VchMoz2</i>	-	(21)
<i>VchMoz3</i>	<i>V. cholerae</i> 7AMOZ	Environmental, 2002, Mozambique	-	ICE <i>VchMoz3</i>	-	(21)
<i>VchMoz4</i>	<i>V. cholerae</i> 8AMOZ	Environmental, 2002, Mozambique	-	ICE <i>VchMoz4</i>	-	(21)
<i>VpaMoz1</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 21AMOZ	Environmental, 2002, Mozambique	-	ICE <i>VpaMoz1</i>	-	(21)

Design of an MGI capture system and MGI sequencing

The identification of five putative MGIs in environmental *Vibrios* isolated from the African continent was a great opportunity to take a look at the diversity and variability of MGI structures and sequences. However, since MGIs usually are integrated into the chromosome, excise at low frequency and do not seem to replicate autonomously, extraction of MGI DNA using standard plasmid preparation protocols was not achievable. To avoid this problem, we devised a strategy allowing us to capture complete MGIs on a low-copy vector (pVB201) more suitable for DNA extraction and sequencing. pVB201 is a derivative of pBeloBac11 (19), a single copy *E. coli* plasmid that allows the cloning and stable maintenance of large DNA fragments. pBeloBac11 was modified to include a 400-bp fragment that encompasses the MGI attachment site (*attB*). This modification enabled Int_{MGI}-catalyzed site-specific recombination between *attB* on pVB201 and *attP* on an excised and transferred MGI to drive MGI capture and retransfer to a recipient strain (Fig. 1). This strategy was derived from a similar approach developed by Wozniak et al. (4) to capture SXT/R391 ICEs; yet it employs a tri-parental mating due to the lack of known selectable markers on the putative MGIs to be recovered. Conjugation was carried out between a *Vibrio* MGI⁺ ICE⁺ donor strain and an *E. coli* intermediate recipient strain (AD175) lacking *dapA* as well as *yicC* (and thus chromosomal *attB*), but harboring pVB201 and R997, the latter being an ICE of the SXT/R391 family conferring resistance to ampicillin. The procedure yielded exconjugant cells containing the transferred MGI integrated into pVB201. The resulting plasmid containing the MGI becomes mobilizable by R997, and can thus be transferred into the final *E. coli* recipient strain also lacking *yicC*. Exconjugants colonies containing the transferred MGI integrated into pVB201 were selected using the Cm^r antibiotic resistance marker present on the plasmid as well as the Tc^r marker of the final *E. coli* recipient strain (AD157). The $\Delta dapA$ mutation ensured the absence of AD175 exconjugants on media not supplemented with diaminopimelic acid (DAP), a phenomenon commonly observed in our initial attempts that we attributed to the Hfr-like mobilization of the Tc^r marker from AD157 back into AD175 mediated by R997

(data not shown). Using this capture system, MGIV φ Ind1 of *V. fluvialis* H-08942 and MGIV φ chMoz6 of *V. cholerae* 16AM0Z relocated into pVB201, with the help of the co-resident ICEs ICEV φ Ind1 (4, 20) and ICEV φ chMoz6 (21), respectively. The resulting plasmids were completely sequenced and assembled. Annotation of the sequences led to the identification of 18 open reading frames (ORFs) in the 23,229-bp MGIV φ Ind1 and 17 ORFs in the 19,740-bp MGIV φ chMoz6.

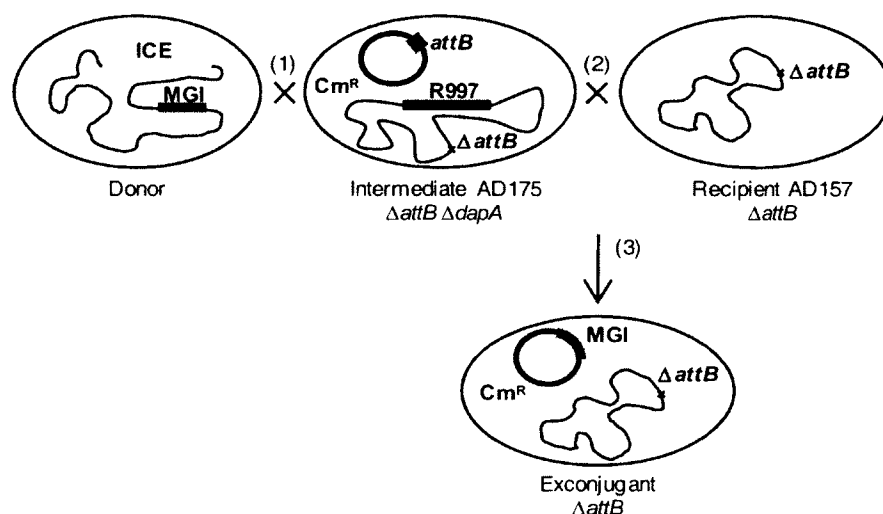


Figure 1. MGI capture system. Conjugation between a donor strain bearing an ICE and an MGI with an intermediate strain (AD175) bearing R997 (1) but lacking *attB* and *dapA* yields exconjugants that contain the transferred MGI integrated into pVB201. These exconjugants cannot be directly selected because of the lack of a selective marker on the MGI; yet the resulting plasmid becomes mobilizable by R997 and transfer to a $\Delta attB$ recipient strain (2), yielding exconjugants harboring pVB201::MGI (3) that can be selected using the chloramphenicol marker present on pVB201 and the ability of the recipient strain (AD157) to grow in the presence of tetracycline and in the absence of diaminopimelic acid (dap).

The MGI family expands and is not restricted to *Vibrio* strains

In addition to the MGIs we identified in our strain collection and sequenced, BLAST analysis of Int_{MGI_{Vch}USA1} against the GenBank database (Release 191.0) revealed the presence of 8 new MGIs in different environmental strains of *V. cholerae* (HE-39, HE-45, HE-48 and HC-43B1), in *Alteromonas macleodii* ‘Deep Ecotype’ and *Alteromonas* sp. SN2, in *Pseudoalteromonas* sp. BSi20311, and in *Methylophaga aminisulfidivorans* MP (see Table 2 for strain details).

All of these new MGIs share the same conserved features that characterize the family, are integrated into the same site and exhibit variable DNA regions (Fig. 2A). Interestingly, out of 12 sequenced MGIs, as many as 9 different structures emerge based on the gene content and orientation in each variable region. Only two structures appear in more than one MGI. The first pattern is observed for MGI_{Vfl}Ind1 and MGI_{Vch}Hai4 found in the Indian *V. fluvialis* H-08942 and in the Haitian *V. cholerae* HE45 isolates, respectively. The second conserved pattern is observed for MGI_{Vch}Moz6, MGI_{Vch}Hai2 and MGI_{Vch}Hai5 found in three environmental *V. cholerae* strains, respectively isolated from environmental or clinical sources in Mozambique and Haiti. Therefore, the structure of MGIs gives us crucial clues on strain circulation. Indeed, MGI_{Vfl}Ind1 and MGI_{Vch}Hai4, isolated in two opposite parts of the globe (India and Haiti, respectively) have the same exact gene content and orientation in each variable region. It is also the case for MGI_{Vch}Moz6, MGI_{Vch}Hai2 and MGI_{Vch}Hai5, isolated in Mozambique and Haiti, respectively.

Although the overall genetic diversity of MGIs is rather limited, strains isolated from the same geographical area harbor MGIs exhibiting rather dissimilar variable regions. Out of five Haitian *V. cholerae* strains collected in 2010 (22), three contain different MGIs (MGI_{Vch}Hai1, MGI_{Vch}Hai2, and MGI_{Vch}Hai4), and a fourth contains an atypical GI, GIV_{ch}Hai3, which lacks *cds8*, *rdfM* as well as a part of *oriT_{MGI}* (repeats R1, R2 and R3 are missing) and is likely no longer mobilizable by SXT/R391 ICEs (Fig. 2A and 2B, Table 2).

This diversity in a small group of strains isolated during the same period and in the same area suggests frequent exchange of MGIs between strains or frequent recombination events between MGIs or with other mobile genetic elements in the environment.

Our results support the idea that the MGI family is not restricted to *Vibrios*, but still appears to be limited to gammaproteobacteria, and more precisely to marine bacteria. Indeed, the most divergent elements of the family, MGI*Ama*Med1, MGI*Asp*Kor1 and MGI*Psp*Arc1, were all found in marine strains of the genera *Alteromonas* and *Pseudoalteromonas* (Mediterranean, Yellow, and Arctic seas) (see Fig 2A and Table 2).

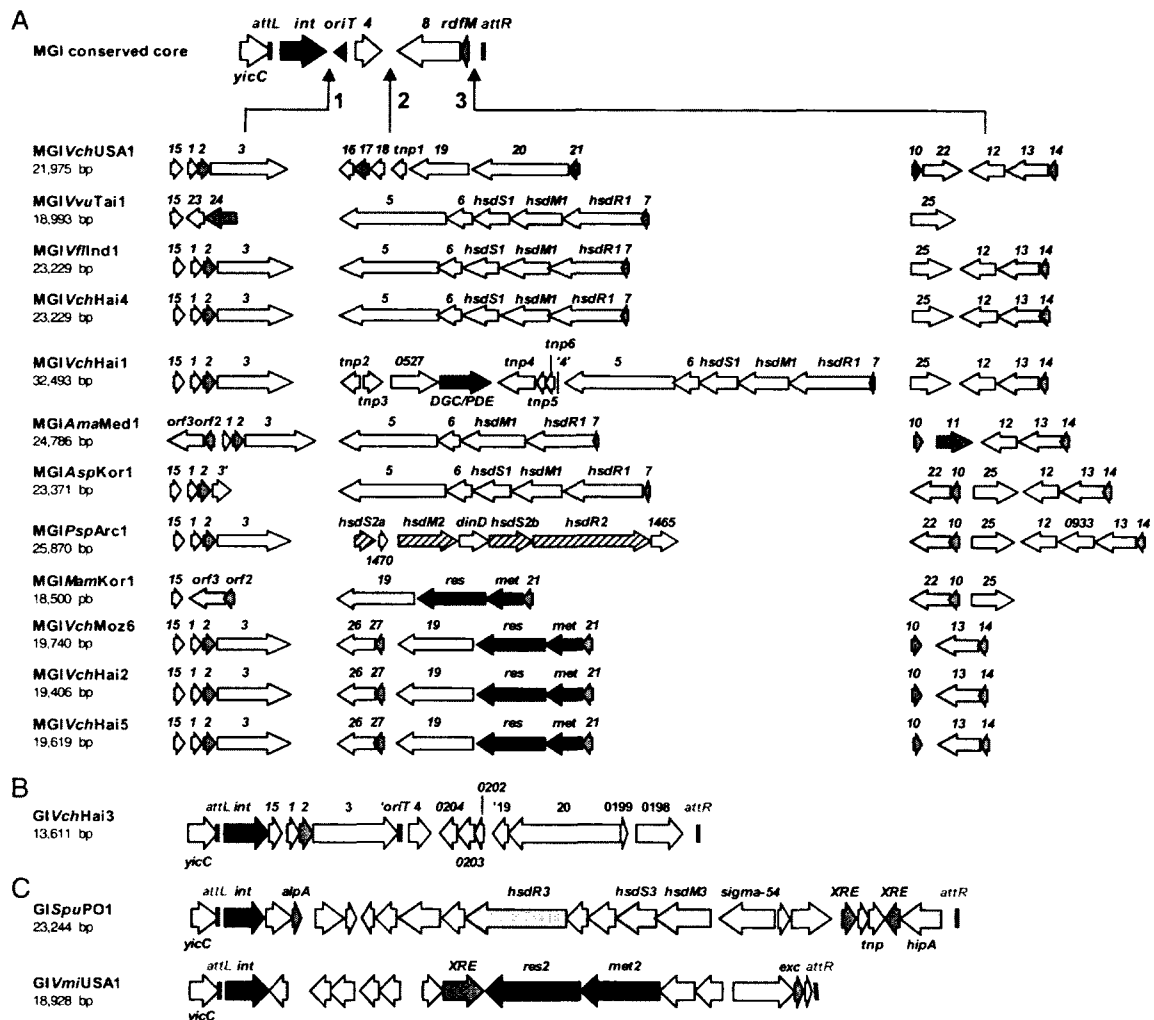


Figure 2. General structures of MGIs and phylogenetic analyses of the core genes. (A) Genetic structure of 12 sequenced MGIs. (B) Atypical structure of GIVchHai3, from *Vibrio cholerae* H-09. (C) Genetic content of GISpuPO1 and GIVmiUSA1 from *Shewanella* sp. W3-18-1 and *Vibrio mimicus* VM573, respectively. Colors of the predicted open reading frames indicate the following putative functions: pink and red, DNA replication, recombination and repair; purple, diguanylate cyclase/phosphodiesterase; blue, transcription; green, restriction-modification systems; orange, putative HipA-like toxin; grey, unknown function. See table S2 for predictions of putative function of genes identified in variable regions.

MGI genetic content

The sizes of MGIs vary from 18,500 bp to 32,493 bp. Based on the analysis of 13 fully and 4 partially sequenced MGIs, we observe that with the exception of the atypical *GIVchHai3* the core structure of MGIs appears to be restricted to *oriT*_{MGI} and 4 conserved genes *int*_{MGI}, *cds4*, *cds8*, and *rdfM*. We previously showed that *Int*_{MGI} mediates the site-specific integration and excision of MGIs into and from the chromosome of their host (6, 7). *RdfM* is required only for the excision process (7). To date the functions of *cds4* and *cds8* remain unknown. Comparison of the different *oriT*_{MGI} sequences revealed the conservation of the imperfect direct and inverted repeats that have been previously identified in *oriT*_{SXT} (23) (Fig. S1). Such structures likely play a role in the specific recognition of the *oriT* by the putative relaxase *Tral* and/or auxiliary proteins during conjugative transfer initiation. This observation suggests that the *oriTs* of these newly identified MGIs are functional, which is actually supported by the result of our MGI capture approach described above for *MGIvflInd1* and for *MGIvchMoz6*. Interestingly this alignment also highlights two additional regions almost perfectly conserved among SXT and MGIs (Fig. S1, positions 53-67 and 78-90). Given their conservation these regions might also play an important role in transfer initiation for both ICEs and MGIs.

Three variable regions can be observed in the sequenced MGIs and to date each MGI exhibits the three regions, with different genetic contents from one MGI to the other (Fig. 2A). The genetic content of each region is described in Table S2. The first variable region is inserted between *int*_{MGI} and *oriT*. In this locus, MGIs often contain *cds15*, *cds1*, *cds2* and *cds3*. *MGIamaMed1* and *MGIamKor1* harbor a putative toxin/antitoxin system (*orf3/orf2*) also found in ICEs R391 and *ICEvchMex1* (4). This system is related to the *E. coli* toxin/antitoxin system *hipA/hipB* which mediates multidrug tolerance (8). *orf3/orf2* could also promote MGI's maintenance in a manner similar to that of the MosAT system recently identified in the ICE SXT (24).

The second variable region, located between *cds4* and *cds8*, appears to be the most variable one. In all but one MGI putative R/M systems are found in this region. Two of them are type I host-specific defense (*hsd*) systems. The *hsdRMS1* system is found in MGIVvuTail, MGIVflInd1, MGIVchHai4, MGIVchHai1, MGLAmaMed1 and MGLAspKor1. The *hsdRMS2* system is found in MGIPspArc1 only. At the same locus, MGIMamKor1, MGIVchMoz6, MGIVchHai2 and MGIVchHai5 harbor a putative type III R/M system which is composed of two genes encoding a methyltransferase (*met*) and a restriction endonuclease (*res*). R/M systems allow bacteria to distinguish invading foreign DNA from their own genome, conferring resistance to infection by bacteriophages. The prevalence of R/M systems in MGIs could be strongly selected by the pressure exerted by bacteriophages in aquatic environments (25, 26) and confer a selective benefit to strains harboring such elements. Interestingly, MGIVchHai1 also harbors in variable region 2 a transposon-like structure flanked by multiple putative transposases and encoding a putative diguanylate cyclase/phosphodiesterase. These enzymes are involved in the synthesis and degradation of the second messenger c-di-GMP, which is known to increase biofilm formation and decrease motility in *V. cholerae* (27, 28). c-di-GMP is also considered an important player in the transition of *V. cholerae* from a host to persistence in the environment (27, 29). Interestingly, this is not the first report of a diguanylate cyclase/phosphodiesterase encoded on a mobile genetic element. Two diguanylate cyclases have been previously described in ICEs of the SXT/R391 family (30). The presence of such a gene in MGIVchHai1 could alter the pathway regulating the transition from free-living, motile to biofilm lifestyle of its host, which may provide a potential benefit in specific environmental conditions.

The third variable region is located between *rdfM* and *attR* (Fig. 2A). The most common features observed in this region are two distinct toxin/antitoxin systems (*cds10/cds22* and *cds13/cds14*), all related to *E. coli* *hipA/hipB*.

Phylogenetic analysis of MGIs' backbone

In order to explore the evolution of the conserved backbone we constructed phylogenetic trees based on nucleotide sequences of the different core regions, including the one containing *oriT* (Fig. 3). Unlike SXT/R391 ICEs, MGIs have a small core set of conserved sequences, allowing us to construct phylogenetic trees for each region.

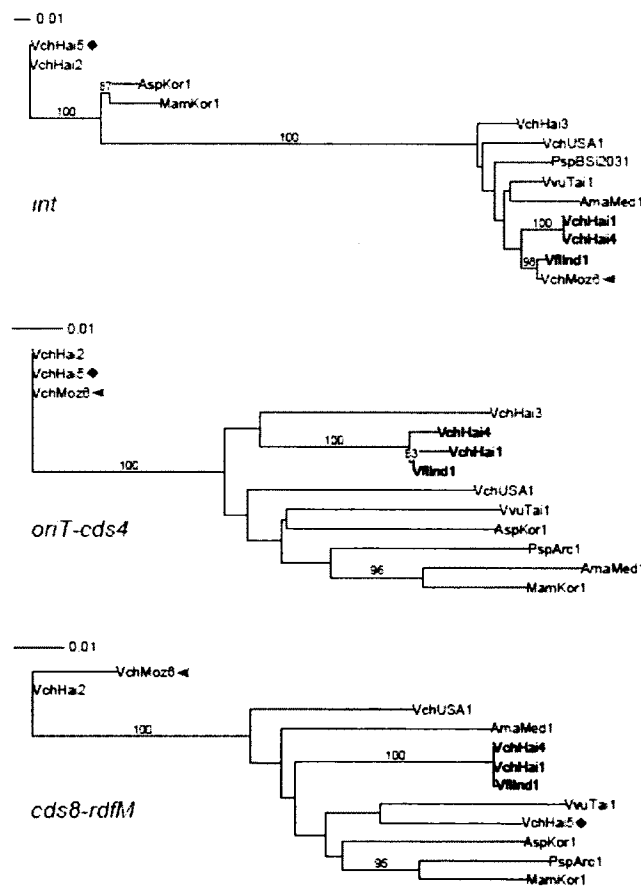


Figure 3. Phylogenetic analysis of the MGI backbone. Phylogenetic trees based on the nucleotide sequences of the indicated core genes or region. Bootstrap values are indicated when over 80%. The individual scale bars represent genetic distances.

Interestingly each region generated distinct branching patterns, highlighting tree incongruences. Although some MGIs always cluster together, as it is the case for *MGIVchHai1*, *MGIVchHai4* and *MGIVflInd1*, others tend to cluster in very different groups depending on the analyzed region. The most striking example is *MGIVchMoz6*, which has an *int* gene almost identical to the one of *MGIVflInd1*, but clusters with *MGIVchHai2* for *oriT-cds4* and *cds8-rdfM* regions (Fig. 3). Similar observations can also be made for *MGIVchHai5*, which clusters with *MGIVchHai2* for *int* and *oriT-cds4*, yet has a more distantly related *cds8-rdfM* region. Such tree incongruences likely reflect a model of evolution of MGIs by inter-MGI recombination events.

A closer look at the distribution of variable genes among the MGIs also suggests evidence of recombination in the evolutionary history of MGIs. The vast majority of the variable genes are always found in more than one MGI. For example *MGIVchUSA1*, *MGIVflInd1*, *MGIPspArc1* and *MGIVchMoz6* have the same genetic content in variable region 1 (Fig. 2A); however, the same MGIs exhibit very different genetic contents in variable region 2 and 3. The genetic variation between the variable DNA of MGIs indicate that these elements are mosaics and again supports the idea that intra-MGI recombination is an important driver of their evolution in a manner similar to that of the SXT/R391 ICEs (4). It was previously shown that when two SXT/R391 ICEs are present in a cell, they can form tandem arrays by integrating into the same site (31), and recombine to form hybrids using either the host protein RecA or a distant relative of the λ Red recombination system that they encode (32, 33). This phenomenon enhances their diversity and drives their evolution. MGIs do not seem to code for putative homologous recombination functions. However, RecA could be responsible for MGI recombination and the involvement of the ICE-encoded recombination system is also likely. In the future it would be interesting to study the ability of MGIs to form tandems, and verify whether some MGIs exclude others as it was reported for the SXT/R391 ICEs (34, 35).

MGIs are part of a wide family of GIs found in various genera

The strong conservation of *int* among MGIs is an interesting tool to search genomic databases for additional related GIs. To date, proteins that share at least 80% identity with Int_{MGIVchUSA1} have systematically revealed an MGI. However, using this method to screen for new MGIs we also found many putative integrases related to Int_{MGI} but falling below the 80% threshold. We wondered whether the genes coding for these integrases were part of GIs that could share a common evolution history with MGIs. The 31 closest integrases (sharing between 69% and 41% identity with Int_{MGIVchUSA1}, Table S3) were included in our analysis. We found that they were encoded by GIs often integrated into the same integration site as the MGIs, as 25 GIs out of 31 (~81%) are integrated into a gene coding for a putative stress induced protein related to *yicC* of *E. coli*. We constructed phylogenetic trees based on the translation products of these putative *int* genes or on the nucleotide sequence of *rpoB* for each of these strains and all the strains bearing an MGI (Fig. 4). Nucleotide sequence of *rpoB* was chosen to build the tree to provide a better resolution at the species level, while the amino acid sequence of *int* genes was favored due to the well-known rapid divergence of the nucleotide sequence of genes encoding tyrosine recombinases (36, 37). We found that MGIs form a distinct cluster based on the integrases, even when they originate from the most distant species based on *rpoB* phylogeny (e.g. MGIPspArc1 and MGIVchHai2). This observation suggests frequent loss and horizontal acquisition of MGI by these strains. These results were expected considering the mode of transmission of MGIs and the relative high transfer frequency that we previously observed for MGIVfInd1 (6). Interestingly, only MGIs harbor an *oriT* sequence and *cds4* as well as *cds8* and *rdfM*. None of the GIs encoding a related integrase that clusters outside of the MGI clade harbor a similar structure. This strongly suggests that the related GIs are not mobilizable by ICEs of the SXT/R391 family. However, as MGIs and their related GIs share the same integration site, MGIs might form tandem arrays with these related GIs. Then recombination events could lead to the acquisition of new genes by MGIs. As such,

these related GIs could constitute a significant pool of adaptive genes available for transfer by SXT/R391 ICEs.

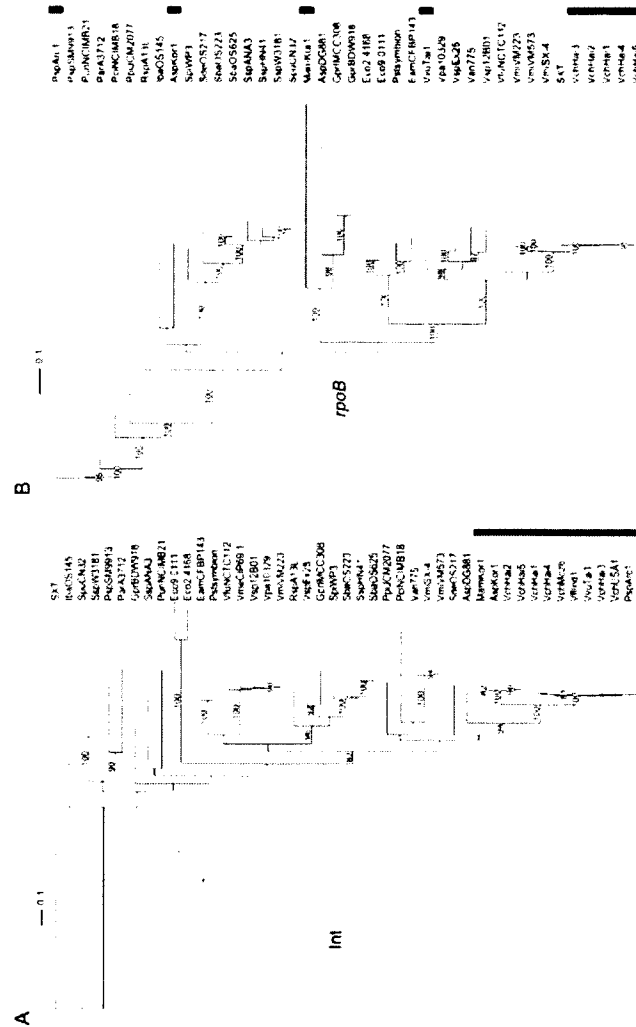


Figure 4. Phylogenetic analysis of MGIs and related GIs. (A) Tree based on protein sequences of Int from SXT, MGIs and 31 related GIs. (B) Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the *rpoB* gene from the corresponding strains. Bootstrap values are indicated when over 80%. The individual scale bars represent genetic distances. Refer to table S3 for GI and strain details.

Excision of putative MGIs and related GIs

Besides the conservation of *oriT* in all the putative MGIs identified to date, another way to confirm their functionality as mobile elements is to verify that they can excise in the presence of an SXT/R391 ICE. We tested the 5 Mozambican MGI⁺ strains by nested PCR to amplify *attP* sequences resulting from MGIs' excision (Fig 5A). Two different sets of primers were used due to the polymorphism of the region located on the left side of *attR* (Table S1). We found that each one of these strains, which all contain an SXT/R391 ICE, yielded a PCR product of expected size (Fig. 5A, lanes 1-5 and 7). Sequence analysis of two of the amplicons confirmed the excision event (Fig. S2), indicating that these MGIs are able to form circular intermediates. Surprisingly, MGL*AmaMed1*, from *A. macleodii* 'Deep Ecotype', an ICE-free strain, was able to excise, yielding a weak PCR product of the expected size (Fig. 5A, lane 6). This result was in contradiction with our previous observations that demonstrated the requirement for SetCD, the main activator of SXT/R391 ICEs, to trigger MGIs' excision (6, 7). However, sequence analysis of this specific amplicon revealed that excision occurred by homologous rather than site-specific recombination (Fig. 5B). In fact, unlike other MGIs, MGL*AmaMed1* harbors a 180-bp repeated region on its internal left side and on the right side of its integration site (highlighted in orange in Fig. S3); this repeated region seems to be long enough to allow homologous recombination to occur. In order to verify whether despite this particular mechanism of excision, MGL*AmaMed1* was still able to respond to induction by SetCD, we introduced R391, the other prototypical member of the SXT/R391 family originally from *P. rettgeri*, into *A. macleodii* 'Deep Ecotype' and repeated the same PCR experiment on an R391⁺ exconjugant. In this case, a strong band corresponding to the amplicon of the expected size was detected, confirming that MGL*AmaMed1*'s excision is still triggered by ICEs of the SXT/R391 family (Fig. 5A, lane 7). The anomalous structure of MGL*AmaMed1*, which seems to be flanked by an *attL* and an *attP* site, suggest that a related GI, or MGI, was integrated on the right side of MGL*AmaMed1* in an ancestor of the strain *A. macleodii* 'Deep Ecotype' and was likely lost, and supports the idea that two or

more MGIs are able to integrate into the same site and form tandem arrays like SXT/R391 ICEs.

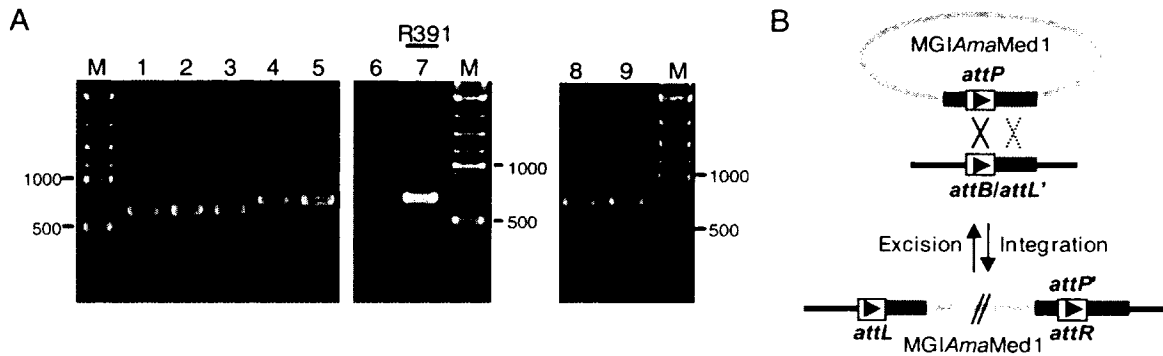


Figure 5. Excision of MGIs and related GIs. (A) Ethidium bromide-stained 1.5% agarose gels of PCR products amplified by nested PCR assays for detection of the excision of the MGIs and related GIs. Lanes: M, 2-Log DNA ladder; 1, MGI*VpaMoz1*; 2, MGI*VchMoz2*; 3, MGI*VchMoz3*; 4, MGI*VchMoz4*; 5, MGI*VchMoz6*; 6 and 7, MGI*AmaMed1*; 8, GII*miUSA1* from *Vibrio mimicus* VM573; 9, GII*SpuPO1* from *Shewanella* sp. W3-18-1. Lane 7, co-resident R391 was present in the cells. (B) Model of excision/integration of MGI*AmaMed1* by site-specific recombination (solid cross-over) and by homologous recombination in the absence of R391 (dotted cross-over). Refer to Figure S3 for details about the alignment of MGI*AmaMed1* attachment sites.

We wondered whether the GIs related to MGIs were also capable to excise by site-specific recombination from the chromosome of their host. We tested the ability of GI*Spu*PO1 and GI*Vmi*USA1 from *Shewanella sp.* W3-18-1 and *V. mimicus* VM573, respectively, (Fig. 2C) to form circular extra-chromosomal molecule by amplifying the resulting *attP* locus by nested PCR (Fig. 5A, lanes 8 and 9). Both GIs yielded PCR products of expected sizes, confirming the excision event. Interestingly *Shewanella sp.* W3-18-1 bears ICE*Spu*PO1, an SXT/R391 ICE, whereas *V. mimicus* VM573 does not harbor any SXT/R391 ICE. This finding suggests that, unlike MGIs, the mechanism of excision of these related GIs does not require activation by the SXT/R391 ICE regulator SetCD.

Concluding remarks

The mechanisms of acquisition of genomic islands are often unknown. There are only few examples of GIs for which the transmission mechanism has been revealed. Non-replicating *Bacteroides* units (NBUs) and Tn4555 have been shown to be excised and mobilized *trans* by *Bacteroides* conjugative transposons (38-40). The high-pathogenicity island (HPI) found in many *Enterobacteriaceae* is linked to ICEs and can be mobilized *cis* by them (41). In *Staphylococcus*, transduction has been found to be the mechanism of transfer of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPIs). SaPIs are mobilized by helper phages that also induce their excision (42). As for MGIs, their mechanism of mobilization is now well understood (6, 7), and this study gives a better understanding on their characteristics and origins.

Genomic islands are often studied from a strain-centric perspective, and extended studies about families of genomic islands are less frequent. We believe such studies have their importance because they provide a better understanding of the mechanisms involved in the transmission and evolution of genomic islands, and the role they play on bacterial genome plasticity.

Acknowledgements

We are grateful to Steve Vo and Nicolas Carraro for their technical assistance and Dominick Matteau for his contribution to the preparation of Illumina sequencing libraries. We thank Mauro M. Colombo (Università di Roma Sapienza, Rome, Italy), Francisco Rodriguez-Valera (Universidad Miguel Hernandez, Spain), Fabiano Thompson (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) and Alexander S. Beliaev (Pacific Northwest National Laboratory, WA, USA) for the kind gift of strains. This work was supported in part by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada. D.C. was supported by a fellowship from Cenci Bolognetti - Institut Pasteur Foundation, Italy and part of the work was funded by a grant from PRIN 2007 - Italy. V.B. holds a Canada Research Chair in molecular biology, impact and evolution of bacterial mobile elements and is a member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne-Le Bel. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. **Osorio CR, Marrero J, Wozniak RA, Lemos ML, Burrus V, Waldor MK.** 2008. Genomic and functional analysis of ICE*PdaSpa1*, a fish-pathogen-derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. *J. Bacteriol.* **190**:3353-3361.
2. **Pembroke JT, Piterina AV.** 2006. A novel ICE in the genome of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1: comparison with the SXT/R391 ICE-like elements. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**:80-88.
3. **Boltner D, MacMahon C, Pembroke JT, Strike P, Osborn AM.** 2002. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J. Bacteriol.* **184**:5158-5169.
4. **Wozniak RA, Fouts DE, Spagnoletti M, Colombo MM, Ceccarelli D, Garriss G, Dery C, Burrus V, Waldor MK.** 2009. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* **5**:e1000786.
5. **Burrus V, Marrero J, Waldor MK.** 2006. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* **55**:173-183.
6. **Daccord A, Ceccarelli D, Burrus V.** 2010. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Mol. Microbiol.* **78**:576-588.
7. **Daccord A, Mursell M, Poulin-Laprade D, Burrus V.** 2012. Dynamics of the SetCD-Regulated Integration and Excision of Genomic Islands Mobilized by Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 Family. *J. Bacteriol.* **194**:5794-5802.
8. **Schumacher MA, Piro KM, Xu W, Hansen S, Lewis K, Brennan RG.** 2009. Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* **323**:396-401.
9. **Van Melder L, Saavedra De Bast M.** 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* **5**:e1000437.

10. **Wilson GG, Murray NE.** 1991. Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* **25**:585-627.
11. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
12. **Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-6145.
13. **Rodrigue S, Materna AC, Timberlake SC, Blackburn MC, Malmstrom RR, Alm EJ, Chisholm SW.** 2010. Unlocking short read sequencing for metagenomics. *PLoS One* **5**:e11840.
14. **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
15. **Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**:307-321.
16. **Edgar RC.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**:1792-1797.
17. **Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T.** 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**:1972-1973.
18. **Letunic I, Bork P.** 2011. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* **39**:W475-478.
19. **Kim UJ, Birren BW, Slepak T, Mancino V, Boysen C, Kang HL, Simon MI, Shizuya H.** 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **34**:213-218.
20. **Ahmed AM, Nakagawa T, Arakawa E, Ramamurthy T, Shinoda S, Shimamoto T.** 2004. New aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Id*, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:947-951.

21. **Taviani E, Ceccarelli D, Lazaro N, Bani S, Cappuccinelli P, Colwell RR, Colombo MM.** 2008. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**:45-54.
22. **Hasan NA, Choi SY, Eppinger M, Clark PW, Chen A, Alam M, Haley BJ, Taviani E, Hine E, Su Q, Tallon LJ, Prosper JB, Furth K, Hoq MM, Li H, Fraser-Liggett CM, Cravioto A, Huq A, Ravel J, Cebula TA, Colwell RR.** 2012. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:E2010-2017.
23. **Ceccarelli D, Daccord A, Rene M, Burrus V.** 2008. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J. Bacteriol.* **190**:5328-5338.
24. **Wozniak RA, Waldor MK.** 2009. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet.* **5**:e1000439.
25. **Breitbart M.** 2012. Marine viruses: truth or dare. *Ann Rev Mar Sci* **4**:425-448.
26. **Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Heldal M.** 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**:467-468.
27. **Jenal U, Malone J.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**:385-407.
28. **Romling U, Amikam D.** 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:218-228.
29. **Ryjenkov DA, Simm R, Romling U, Gomelsky M.** 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**:30310-30314.
30. **Bordeleau E, Brouillette E, Robichaud N, Burrus V.** 2010. Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* **12**:510-523.
31. **Hochhut B, Beaber JW, Woodgate R, Waldor MK.** 2001. Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative

- chromosomally integrating elements that share an attachment site. *J. Bacteriol.* **183**:1124-1132.
32. **Garriss G, Waldor MK, Burrus V.** 2009. Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. *PLoS Genet.* **5**:e1000775.
 33. **Burrus V, Waldor MK.** 2004. Formation of SXT tandem arrays and SXT-R391 hybrids. *J. Bacteriol.* **186**:2636-2645.
 34. **Marrero J, Waldor MK.** 2005. Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer. *Dev. Cell* **8**:963-970.
 35. **Marrero J, Waldor MK.** 2007. The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. *J. Bacteriol.* **189**:3302-3305.
 36. **Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS, 3rd.** 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* **5**:433-440.
 37. **Esposito D, Scocca JJ.** 1997. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.* **25**:3605-3614.
 38. **Wang J, Shoemaker NB, Wang GR, Salyers AA.** 2000. Characterization of a *Bacteroides* mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *J. Bacteriol.* **182**:3559-3571.
 39. **Li LY, Shoemaker NB, Wang GR, Cole SP, Hashimoto MK, Wang J, Salyers AA.** 1995. The mobilization regions of two integrated *Bacteroides* elements, NBU1 and NBU2, have only a single mobilization protein and may be on a cassette. *J. Bacteriol.* **177**:3940-3945.
 40. **Smith CJ, Parker AC.** 1993. Identification of a circular intermediate in the transfer and transposition of Tn4555, a mobilizable transposon from *Bacteroides* spp. *J. Bacteriol.* **175**:2682-2691.
 41. **Paauw A, Leverstein-van Hall MA, Verhoef J, Fluit AC.** 2010. Evolution in quantum leaps: multiple combinatorial transfers of HPI and other genetic modules in Enterobacteriaceae. *PLoS One* **5**:e8662.

42. **Mir-Sanchis I, Martinez-Rubio R, Marti M, Chen J, Lasa I, Novick RP, Tormo-Mas MA, Penades JR.** 2012. Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision. *Mol. Microbiol.* **85**:833-845.
43. **Singer M, Baker TA, Schnitzler G, Deischel SM, Goel M, Dove W, Jaacks KJ, Grossman AD, Erickson JW, Gross CA.** 1989. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **53**:1-24.
44. **Demarre G, Guerout AM, Matsumoto-Mashimo C, Rowe-Magnus DA, Marliere P, Mazel D.** 2005. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalph) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res. Microbiol.* **156**:245-255.
45. **Lopez-Lopez A, Bartual SG, Stal L, Onyshchenko O, Rodriguez-Valera F.** 2005. Genetic analysis of housekeeping genes reveals a deep-sea ecotype of *Alteromonas macleodii* in the Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.* **7**:649-659.
46. **Murray AE, Lies D, Li G, Nealson K, Zhou J, Tiedje JM.** 2001. DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9853-9858.
47. **Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477-483.
48. **Chun J, Grim CJ, Hasan NA, Lee JH, Choi SY, Haley BJ, Taviani E, Jeon YS, Kim DW, Brettin TS, Bruce DC, Challacombe JF, Detter JC, Han CS, Munk AC, Chertkov O, Meincke L, Saunders E, Walters RA, Huq A, Nair GB, Colwell RR.** 2009. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:15442-15447.

49. **Thompson CC, Vicente AC, Souza RC, Vasconcelos AT, Vesth T, Alves N, Jr., Ussery DW, Iida T, Thompson FL.** 2009. Genomic taxonomy of *Vibrios*. *BMC Evol. Biol.* **9**:258.
50. **Chen CY, Wu KM, Chang YC, Tsai HC, Liao TL, Liu YM, Chen HJ, Shen AB, Li JC, Su TL, Shao CP, Lee CT, Hor LI, Tsai SF.** 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* **13**:2577-2587.
51. **Bian F, Xie BB, Qin QL, Shu YL, Zhang XY, Yu Y, Chen B, Chen XL, Zhou BC, Zhang YZ.** 2012. Genome sequences of six *Pseudoalteromonas* strains isolated from Arctic sea ice. *J. Bacteriol.* **194**:908-909.
52. **Math RK, Jin HM, Kim JM, Hahn Y, Park W, Madsen EL, Jeon CO.** 2012. Comparative genomics reveals adaptation by *Alteromonas* sp. SN2 to marine tidal-flat conditions: cold tolerance and aromatic hydrocarbon metabolism. *PLoS One* **7**:e35784.
53. **Kim HG, Doronina NV, Trotsenko YA, Kim SW.** 2007. *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:2096-2101.

Supporting information

Comparative Analysis of Mobilizable Genomic Islands

Aurélié Daccord, Daniela Ceccarelli, Sébastien Rodrigue and Vincent Burrus

Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Supplemental Figure S1.

Supplemental Figure S2.

Supplemental Figure S3.

Supplemental Table S1.

Supplemental Table S2.

Supplemental Table S3.

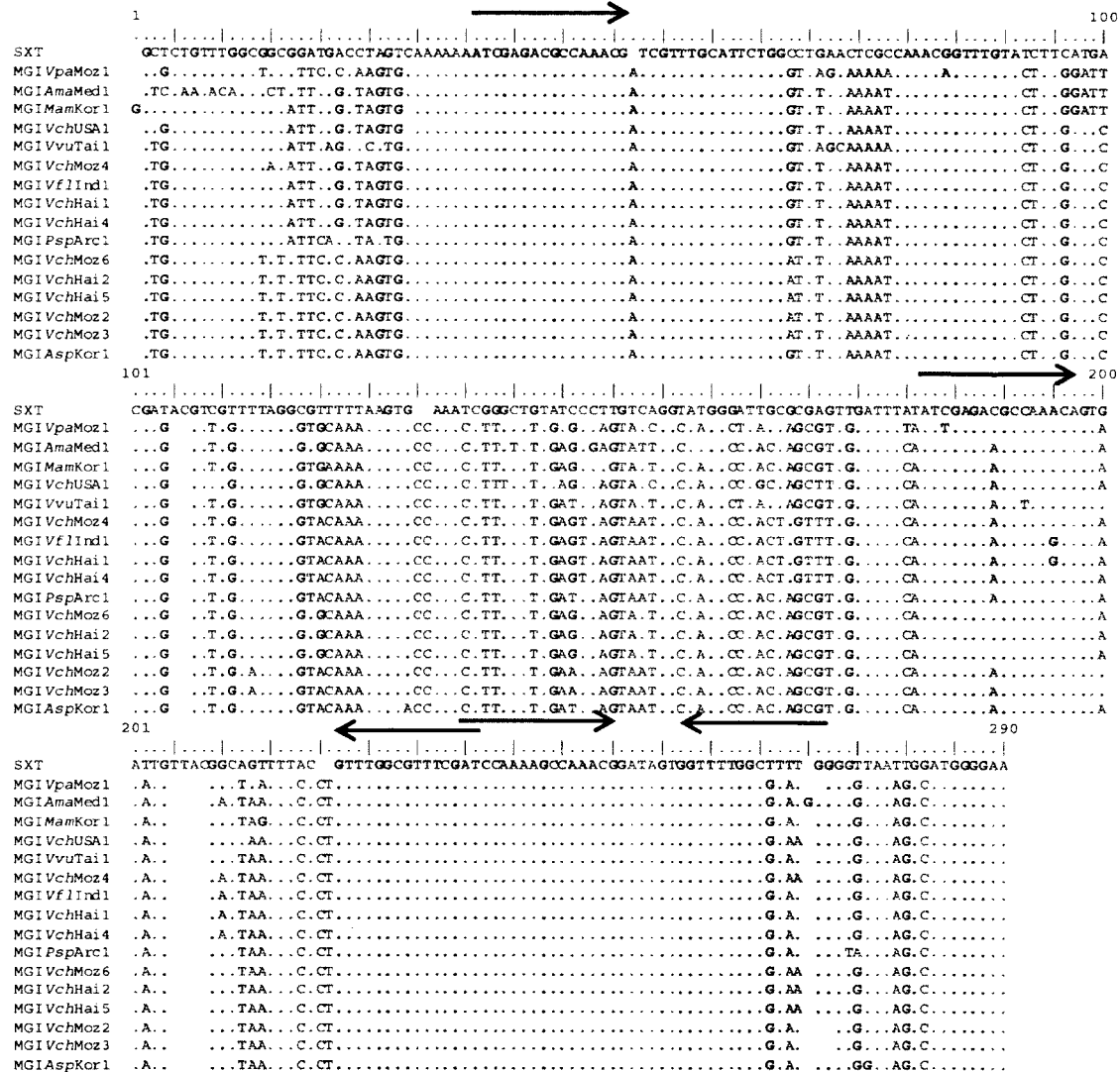


Figure S1. Comparison of *oriT*s in MGIs and SXT. (A) ClustalW2 alignment of *oriT*_{SXT} with related sequences found in 16 MGIs. Identical nucleotides in the genomic islands are represented by dots, whereas nucleotide polymorphisms are indicated at the corresponding positions. The imperfect direct and indirect repeats in *oriT*_{SXT} are shown by arrows and shaded boxes.

Table S1. DNA sequences of the primers used in this study.

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Use in the study
attB-F	NNNNAAGCTTCAAAGAAGCGCGTGAAGTG	Amplification of <i>attB</i> in <i>V. cholerae</i> N16961
attB-R	NNNNAAGCTTAAGCCAAGATAAATCGGC	Amplification of <i>attB</i> in <i>V. cholerae</i> N16961
attB-WF	ATCCTTCCACCTCTCCTTTTATAAACAGGAACGT CTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Deletion of <i>yicC</i> in AD175 and AD157
attB-WR	TTGTGAAGGCGGAAAAGTAAGAATTGGCGTTACG AGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Deletion of <i>yicC</i> in AD175 and AD157
attPAD-L1	TCGGCTTTGCTGTATGCAATA	Amplification of <i>attP</i> 1st round
attPAD-R1-AC	TCTGCCATAGCAACAGCAAT	Amplification of <i>attP</i> for MGIVpaMoz1, MGIVchMoz2, MGIVchMoz3 and MGLAmaMedA 1st round
attPAD-R1-V	GGACACCATAATGTCCATTTCA	Amplification of <i>attP</i> for MGIVchMoz4 and MGIVchMoz6 1st round
attPAD-L2	GAGTTTTCCCATGTTTACTCCATA	Amplification of <i>attP</i> 2nd round
attPAD-R2-AC	GTGACAGCTTTGCCTGCTT	Amplification of <i>attP</i> for MGIVpaMoz1, MGIVchMoz2, MGIVchMoz3 and MGLAmaMedA 2nd round
attPAD-R2-V	CAGGCTGAGTGAGCTTTCTG	Amplification of <i>attP</i> for MGIVchMoz4 and MGIVchMoz6 2nd round
attPAD-L1	TCGGCTTTGCTGTATGCAATA	Amplification of <i>attP</i> 1st round
attPSpu-L1	CACCATTGGGTACCATTGAA	Amplification of <i>attP</i> for GISpuPO1; 1st round
attPSpu-R1	CCATGAAAGCTCCCAAAGAC	Amplification of <i>attP</i> for GISpuPO1; 1st round
attPSpu-L2	GACGCCTTCAGTTTGGACTC	Amplification of <i>attP</i> for GISpuPO1; 2nd round
attPSpu-R2	TGAGCTACTGACAGCGCCTA	Amplification of <i>attP</i> for GISpuPO1; 2nd round
attPVmi-L1	AAGGTTCTCCAGATGCGGGT	Amplification of <i>attP</i> for GIVmiUSA1; 1st round
attPVmi-R1	TCGATGCTTGGTTGATGTCTC	Amplification of <i>attP</i> for GIVmiUSA1; 1st round
attPVmi-L2	GGACCCAAGTGTCATTTCTGG	Amplification of <i>attP</i> for GIVmiUSA1; 2nd round
attPVmi-R2	TGAAGAAACGCCCAATACA	Amplification of <i>attP</i> for GIVmiUSA1; 2nd round

Table S2. Content of the variable regions.

Variable region 1

Feature	Domains/Function
<i>cds1</i>	COG4680
<i>cds2</i>	COG5499, Predicted transcription regulator containing HTH domain
<i>cds3</i>	COG4951, DEXDc, DEAD-like helicases superfamily, HELICc, Helicase superfamily C-terminal domain, SSL2, DNA or RNA helicases of superfamily II
<i>cds15</i>	-
<i>cds23</i>	-
<i>cds24</i>	HTH_XRE, Helix-turn-helix XRE-family like proteins, COG1476, Predicted transcriptional regulators, COG2856, Predicted Zn peptidase
<i>orf2</i>	Helix-turn-helix XRE-family like proteins, Transcriptional Regulator
<i>orf3</i>	HipA-like domain, CD HipA-N and HipA-C

Variable region 2

Feature	Domains/Function
<i>cds5</i>	COG1204, Superfamily II helicase, DEXDc, DEAD-like helicases superfamily, HELICc, Helicase superfamily C-terminal domain
<i>cds6</i>	-
<i>cds7</i>	Putative transcriptional regulator, Excisionase/Xis, DNA-binding
<i>cds16</i>	-
<i>cds17</i>	Possible transcriptional regulator with HTH domain, CI/Cro family
<i>cds18</i>	-
<i>cds19</i>	COG1700, Uncharacterized conserved protein [Function unknown]
<i>cds20</i>	COG3886, Predicted HKD family nuclease, SSL2, DNA or RNA helicases of superfamily II
<i>cds21</i>	COG4190, Predicted transcriptional regulator
<i>cds26</i>	Putative transcription regulator with HTH domain-containing protein
<i>cds27</i>	DUF2136, domain of unknown function
<i>cds0527</i>	cd06225, Histidine kinase, Adenylyl cyclase, Methyl-accepting protein, and Phosphatase (HAMP) domain cd11386, Methyl-accepting chemotaxis protein (MCP), signaling domain
<i>cds1465</i>	DUF45, domain of unknown function smart00731, SprT homologues.; Predicted to have roles in transcription elongation pfam08325, WLM domain; predicted metallopeptidase domain
<i>cds1470</i>	DUF2188, domain of unknown function
<i>DGC/PDA</i>	cd01948, EAL domain, putative phosphodiesterase function cd01949, Diguanylate-cyclase (DGC) or GGDEF domain cd00130, PAS domain
<i>dinD</i>	pfam02498, BRO family, N-terminal domain PRK11525, DNA-damage-inducible protein D
<i>hsdM1</i>	COG0286, HsdM, Type I restriction-modification system methyltransferase subunit, Methylase_S
<i>hsdR1</i>	COG4096, HsdR, Type I site-specific restriction-modification system, R (restriction) subunit and related helicases
<i>hsdS1</i>	COG0732, HsdS, Restriction endonuclease S subunits, Methylase_S, Type I restriction modification DNA specificity domain
<i>met</i>	cd00315, DNA-cytosine methyltransferase
<i>res</i>	COG1401, GTPase subunit of restriction endonuclease [Defense mechanisms]
<i>hsdS2a</i>	pfam01420, Type I restriction modification DNA specificity domain

<i>hsdS2b</i>	pfam01420, Type I restriction modification DNA specificity domain
<i>hsdM2</i>	pfam12161, HsdM N-terminal domain, methylase subunit of Type I DNA methyltransferases pfam13659, Methyltransferase domain
<i>hsdR2</i>	cd00046, DEAD-like helicases superfamily pfam04313, Type I restriction enzyme R protein N terminus (HSDR_N)
<i>tnp1</i>	Y1_Tnp[pfam01797], Transposase IS200 like
<i>tnp2</i>	DUF4096[pfam13340], Putative transposase of IS4/5 family
<i>tnp3</i>	DUF4096[pfam13340], Putative transposase of IS4/5 family
<i>tnp4</i>	DDE_Tnp_IS66[pfam03050], Transposase IS66 family
<i>tnp5</i>	TnpB_IS66[pfam05717], IS66 Orf2 like protein
<i>tnp6</i>	HTH_Tnp_1[pfam01527], Transposase

Variable region 3

Feature	Domains/Function
<i>cds10</i>	Helix-turn-helix XRE-family like proteins, Transcriptional Regulator
<i>cds11</i>	HTH_Cfa, Putative helix-turn-helix (HTH) MerR-like transcription regulator, Methyltransf_11, Methyltransferase domain
<i>cds12</i>	-
<i>cds13</i>	COG3550, HipA, HipA_C, HipA-like C-terminal domain.
<i>cds14</i>	HTH_XRE, Helix-turn-helix XRE-family like proteins
<i>cds22</i>	HipA protein
<i>cds25</i>	COG1373, Predicted ATPase (AAA+ superfamily)
<i>cds0933</i>	SecC motif-containing protein

Table S3. Strains harboring integrases related to Int_{MGI}.

Genomic Island	Strain	GenBank accession number	Locus tag	% identity with Int _{MGI}	Integrated into virC
AspDG881	<i>Alcanivorax</i> sp. DG881	ZP_05041922.1	ADG681_1445	69	ND
SdeOS217	<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	YP_561335.1	Sden_0317	61	yes
Van775	<i>Vibrio anguillarum</i> 775	YP_004565005.1	VAA_02447	60	yes
SpiWP3	<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	YP_002311531.1	swp_2194	60	yes
PpuJCM20779	<i>Pseudomonas piscicida</i> JCM 20779	ZP_10390803.1	PpsJ_010100017837	59	yes
VmiUSAI	<i>Vibrio mimicus</i> VM573	ZP_05715605.1	VMD_06510	59	yes
VmisX-4	<i>Vibrio mimicus</i> SX-4	EGU17602.1	SX4_2314	59	No
SbaOS223	<i>Shewanella balnica</i> OS223	YP_002356350.1	Sbal223_0393	58	yes
RspA13L	<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	ZP_08571744.1	Rheu_3167	58	yes
SbaOS625	<i>Shewanella balnica</i> OS625	EHC05170.1	Sbal625DRAFT_3303	57	yes
VmeCIP69 14	<i>Vibrio mesochlorophyllus</i> CIP 69 14	ZP_05883393.1	VIB_002960	57	yes
VfuNCTC11216	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11216	YP_004991412.1	vfu_A00165	57	yes
VmiVM223	<i>Vibrio furnissii</i> VM223	ZP_06031488.1	VMA_000189	57	yes
Vpa10329	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 10329	EGF42623.1	VP10329_01285	57	yes
VspEx25	<i>Vibrio</i> sp. Ex25	ZP_04922021.1	VEx25_0128	57	yes
GprIMCC3088	<i>Gamma proteobacterium</i> IMCC3088	ZP_08271592.1	IMCC3088_2304	57	yes
Psisymbiont	<i>Planctia stali</i> symbiont	ZP_08254803.1	Ptas_010100014596	57	yes
EamCFBP1430	<i>Erwinia amylovora</i> CFBP1430	YP_003529425.1	EAMY_0067	57	yes
SspHN41	<i>Shewanella</i> sp. HN-41	ZP_08568045.1	SOHN41_03528	56	yes
Vsp12B01	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01	ZP_00989468.1	V12B01_02985	56	yes
SspANA3	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	YP_871403.1	Shewana3_3779	52	yes
PcuNCIMB1889	<i>Pseudomonas cinerea</i> NCIMB 1889	ZP_10271572.1	PcuN1_010100010268	51	yes
GprBDW918	<i>Gamma proteobacterium</i> BDW918	ZP_10066331.1	DOK_17240	50	yes
SpuPO1	<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1	YP_961735.1	Spuw3181_0330	49	yes
SpuCN32	<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	YP_001184416.1	Spuw3181_0330	49	No
PpsSM9913	<i>Pseudomonas</i> sp. SM9913	YP_004069903.1	Spuw3181_0330	49	No (tRNA)
PpuNCIMB2128	<i>Pseudomonas undina</i> NCIMB 2128	ZP_10304438.1	Ppuw3181_0330	46	yes
ParA3712	<i>Pseudomonas arctica</i> A 37-1-2	ZP_10283485.1	ParA3_010100020257	45	yes
IbaOS145	<i>Idiomarina balnica</i> OS145	ZP_01042544.1	OS145_08908	44	yes
Eco2-4168	<i>Escherichia coli</i> 2-4168	EH66273.1	EC24168_3980	42	No (tRNA)
Eco9 0111	<i>Escherichia coli</i> 9 0111	EU1812.1	EC90111_2351	41	No (tRNA)

CHAPITRE 3. DISCUSSION

Depuis maintenant plusieurs années le transfert horizontal est reconnu comme la force principale dans le mouvement évolutif des bactéries. Cette évolution se fait de façon extrêmement rapide à la fois à cause de la rapidité de multiplication des bactéries mais aussi et surtout à cause de cette capacité qu'elles ont de transférer de larges fragments d'ADN par transfert horizontal, dont le principal mécanisme est la conjugaison.

Les îlots génomiques sont étroitement reliés au transfert horizontal. En effet, leur définition même implique qu'ils ont été acquis par leur hôte grâce à ce mécanisme. L'excision de certains îlots génomiques a été démontrée (Blum *et al.*, 1994; Hochhut *et al.*, 2006; Middendorf *et al.*, 2004; Murphy et Boyd, 2008), sans que le mécanisme de mobilisation n'ait toutefois pu être élucidé.

Ce projet doctoral avait pour but d'étudier le mécanisme de transfert d'une nouvelle famille d'îlots génomiques, initialement identifiée dans des espèces des genres *Vibrio* et *Alteromonas*. La présence au sein de ces îlots génomiques d'une séquence similaire à l'*oriT* des ICE de la famille SXT/R391 nous avait conduit à émettre l'hypothèse que ces îlots génomiques étaient mobilisables par les ICE de cette famille. C'est pourquoi nous avons nommé ces éléments MGI pour îlots génomiques mobilisables (« *Mobilisable Genomic Islands* »).

Les résultats obtenus sont regroupés dans trois publications. La première a permis de poser les bases du mécanisme de mobilisation des MGI (Daccord *et al.*, 2010), la seconde a

permis d'approfondir les aspects de l'excision, de l'intégration ainsi que de la régulation de ces phénomènes chez les MGI (Daccord *et al.*, 2012b), et enfin la troisième offre un aperçu de la diversité génétique de cette nouvelle famille d'éléments mobilisables (Daccord *et al.*, 2012a).

Dans la première partie du projet, j'ai démontré que les MGI sont effectivement mobilisables par les ICE de la famille SXT/R391. Cette mobilisation passe par la reconnaissance de l'*oriT* similaire par les protéines du relaxosome des ICE SXT/R391. Il s'agit donc d'une reconnaissance spécifique, et par conséquent d'une adaptation spécifique des MGI aux ICE SXT/R391. Dans cette étude j'ai également démontré la mobilisation de larges fragments d'ADN chromosomique par les ICE SXT/R391 à partir du locus *oriT* des MGI. Cette découverte a renforcé l'impact des ICE SXT/R391 sur la plasticité génomique et l'évolution des espèces bactériennes concernées. Finalement, j'ai démontré que les MGI ne s'excisent qu'en présence d'un ICE, et plus particulièrement que SetCD, le complexe activateur de la transcription des gènes de transfert chez les ICE SXT/R391, était responsable de l'induction de l'excision des MGI. Ce résultat m'a menée à regarder plus en détails les phénomènes d'excision et d'intégration des MGI, ainsi que leur régulation.

La deuxième partie du projet a donc été consacrée à une étude des mécanismes d'excision et d'intégration des MGI. Dans cette étude j'ai vérifié la capacité de l'intégrase des MGI à catalyser seule leur intégration site-spécifique au sein du chromosome. Pour l'excision, j'ai montré que l'intégrase n'était pas suffisante, en effet, j'ai mis en évidence la nécessité d'un nouveau facteur de direction de la recombinaison (RDF) codé par un gène présent sur le squelette de gènes commun des MGI. Ensuite, j'ai démontré l'action de SetCD sur l'activation de la transcription à la fois de l'intégrase et du RDF des MGI, ce qui entraîne leur excision en présence d'un ICE SXT/R391. Finalement, cette étude a permis de lever le voile sur une interrogation laissée en suspens par l'étude précédente : comment un MGI

s'intègre-t-il dans un nouvel hôte dépourvu d'un ICE SXT/R391 ? L'analyse de l'expression du gène codant pour l'intégrase des MGI a révélé un niveau basal d'expression en absence de SetCD, c'est ce faible niveau d'expression qui permet l'intégration des MGI indépendamment de la présence d'un ICE.

Dans la troisième et dernière partie du projet j'ai effectué une analyse comparative des MGI. Grâce à un système de capture j'ai séquencés deux MGI, qui se sont ajoutés à d'autres MGI identifiés par BLAST. La famille des MGI s'étant élargie à 16 éléments, dont 12 séquencés, il devenait possible de réaliser une étude phylogénétique. Les résultats de cette étude indiquent une probable évolution des MGI par recombinaison. De plus une analyse bioinformatique a révélé l'appartenance des MGI à une vaste famille d'îlots génomiques partageant comme caractéristiques : (i) une intégrase similaire, et (ii) ils sont généralement intégrés dans un gène apparenté à *yicC* chez *E. coli*. J'ai démontré pour deux îlots génomiques apparentés aux MGI leur capacité à s'exciser du chromosome de leur hôte. L'un d'entre eux s'excise sans présence d'un ICE de la famille SXT/R391, ce qui laisse penser que, contrairement aux MGI, l'excision de ces îlots génomiques est indépendante de la présence d'un ICE SXT/R391.

3.1. Mécanisme et régulation de l'excision, du transfert et de l'intégration des MGI

La mobilisation des MGI requiert la succession ordonnée des cinq étapes suivantes : (i) leur excision site-spécifique à partir du chromosome de la cellule donneuse, (ii) l'initiation du transfert au niveau de l'*oriT*, (iii) le transfert du brin d'ADN dans la cellule réceptrice, (iv) la synthèse du brin complémentaire d'ADN dans la cellule réceptrice et (v) l'intégration site-spécifique au sein du chromosome de la cellule réceptrice.

L'étude du mécanisme d'excision des MGI a permis l'identification d'un nouvel RDF. Cette découverte n'était pas inattendue ; en effet, les recombinaisons site-spécifiques font généralement appel à un RDF pour l'excision, tandis que l'intégrase seule est habituellement suffisante pour catalyser l'intégration (Lewis et Hatfull, 2001). Plusieurs RDF ont été identifiés dans différents types d'îlots génomique, tels que des prophages (Cali *et al.*, 2004; Coddeville et Ritzenthaler, 2010; Savinov *et al.*, 2012), des ICE (Burrus et Waldor, 2003; Lee *et al.*, 2007) ou des îlots de pathogénicité (Almagro-Moreno *et al.*, 2010; Lesic *et al.*, 2004). D'après mes résultats, RdfM entrerait dans la famille de RDF SLP1 (Lewis et Hatfull, 2001) ; cette famille regroupe des RDF ayant de l'homologie avec le RDF identifié dans l'élément intégratif SLP1 chez *Streptomyces lividans* (Brasch et Cohen, 1993). Dans cette famille on trouve également les RDF des phages P4 (Cali *et al.*, 2004), phi-R73 (Sun *et al.*, 1991) et de l'îlot de pathogénicité HPI (Buchrieser *et al.*, 1998; Lesic *et al.*, 2004). Tous ces éléments ont un autre point commun : leur intégration et leur excision sont catalysées par une intégrase de type P4. Par ailleurs, Vis, le RDF du phage P4, régule négativement l'expression de l'intégrase de ce même phage (Piazzolla *et al.*, 2006). Mes résultats n'indiquent aucune activité régulatrice de RdfM sur l'expression de l'intégrase des MGI, bien qu'il comporte, en plus du motif hélice-tour-hélice (HTH) commun aux RDF de la famille SLP1, un deuxième motif HTH putatif dont la fonction demeure à ce jour inconnue.

L'excision des MGI est un phénomène qui s'est révélé particulièrement intéressant, puisque celle-ci n'est induite qu'en présence d'un ICE de la famille SXT/R391. Mes recherches ont montré l'activation transcriptionnelle des gènes *int* et *rdfM*, codant respectivement pour l'intégrase et le RDF des MGI, par SetCD, le complexe activateur transcriptionnel des gènes de transfert des ICE SXT/R391. Bien que l'intégrase soit tout de même exprimée en absence de SetCD, RdfM ne l'est pas ; or, mes résultats indiquent que ce dernier est

strictement requis pour l'excision, c'est ce qui explique qu'aucune excision n'est détectée en absence de SetCD. La stricte nécessité de RdfM pour l'excision des MGI est en contraste avec les résultats obtenus avec Xis, le RDF de SXT. En effet, la délétion de *se* dernier a un impact sur l'excision de SXT sans toutefois l'inhiber complètement (Burrus et Waldor, 2003). La nécessité de RdfM pour l'excision des MGI couplée à son activation par SetCD est un mécanisme qui a pu être sélectionné par les MGI afin de promouvoir leur maintenance au sein du chromosome. L'activation de l'excision d'un élément mobilisable par un ICE a déjà été observée dans le cas des NBU chez *Bacteroides* (Stevens *et al.*, 1992). Cependant, bien qu'une région strictement nécessaire à l'excision de NBU1 ait été identifiée (Shoemaker *et al.*, 2000), le mécanisme exact par lequel l'ICE induit l'excision du NBU demeure inconnu. L'activation de l'excision des MGI et des NBU par l'élément qui les mobilise représente un mécanisme bénéfique à la fois en termes d'économie d'énergie, puisque l'élément ne peut de toute façon être transféré en l'absence de l'ICE, mais également en termes de maintenance de ces petits îlots génomiques. En effet, l'absence de mécanisme réplcatif propre à ces éléments les rend vulnérables une fois excisés. En tenant compte de la rapidité à laquelle une population bactérienne se multiplie, on comprend qu'il serait aisé de perdre un tel élément excisé si celui-ci ne se réplique pas de façon autonome.

Une fois l'étape de l'excision complétée vient l'étape de l'initiation du transfert conjugatif. Chez les ICE, à cette étape-ci, le relaxosome reconnaît l'*oriT* sur la molécule excisée afin de couper un des deux brins qui sera ensuite transféré dans la cellule réceptrice au travers du pore de conjugaison. Il s'agit de l'étape pour laquelle le mécanisme de mobilisation des MGI est inédit. En effet, à ma connaissance, les MGI sont le premier cas rapporté d'un îlot génomique comportant une séquence similaire à l'*oriT* d'un ICE, permettant à l'îlot d'être reconnu par le relaxosome de l'ICE pour être transféré dans une cellule réceptrice. Ce mécanisme permet aux MGI d'être mobilisés sans coder pour aucune protéine de mobilisation ; en ce sens, ils peuvent être vus comme des « parasites », profitant de la

machinerie conjugative complexe des ICE SXT/R391. Les NBU, qui ont à ce jour le mécanisme de mobilisation le plus proche des MGI emploient une technique différente : bien que leur excision soit induite par les ICE, et que leur mobilisation passe par le pore de conjugaison de ces derniers, ils possèdent toutefois leur propre *oriT* associée à leur propre relaxase (Li *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995). À l'inverse des MGI, les NBU ne reposent donc pas sur les ICE qui les mobilisent en ce qui concerne l'initiation du transfert au niveau de l'*oriT*. Chaque nouveau mécanisme de mobilisation découvert prouve qu'il en reste sûrement plus encore à découvrir et que la mobilisation des îlots génomiques a certainement encore beaucoup de choses à nous révéler.

L'étape suivant l'initiation du transfert conjugal est le transfert lui-même vers la cellule réceptrice. Le pore de conjugaison des ICE de la famille SXT/R391 est un système de sécrétion de type IV apparenté au système conjugal du plasmide F (Beaber *et al.*, 2002). Pour sa formation, ce pore de conjugaison requiert la participation de trois opérons de gènes « *tra* » localisés dans le squelette de gènes communs des ICE SXT/R391. Aucun gène présentant de l'homologie avec un quelconque gène *tra* n'a été identifié chez les MGI. Les MGI prennent donc pleinement avantage du pore synthétisé par l'ICE afin d'être transférés dans la cellule réceptrice. Les MGI ne sont pas les seuls éléments à utiliser le pore de conjugaison des ICE SXT/R391 ; en effet, les plasmides RSF1010 et CloDF13 sont mobilisables par SXT (Hochhut *et al.*, 2000). Contrairement aux MGI, il a été démontré que CloDF13 utilise uniquement le pore de conjugaison de SXT et non les protéines d'initiation du transfert (Beaber *et al.*, 2002).

La dernière étape de la mobilisation des MGI est l'intégration dans le chromosome de la cellule hôte. Mes résultats indiquent que l'intégrase est la seule protéine des MGI requise pour cette étape du transfert. Ces résultats sont en accord avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature pour les phénomènes d'intégration site-spécifique (Lewis et Hatfull, 2001).

Mes résultats indiquent également que les ICE de la famille SXT/R391 ne jouent aucun rôle dans l'intégration des MGI ; en effet, aucune protéine des ICE n'est nécessaire pour catalyser leur intégration site spécifique, et le complexe régulateur SetCD n'est pas requis pour l'expression de *int*, bien qu'il puisse fortement activer son expression, puisque les MGI peuvent s'intégrer dans une cellule réceptrice dépourvue d'un ICE SXT/R391. L'indépendance des MGI concernant leur intégration permet d'assurer leur maintenance au sein d'une population de cellules dans laquelle l'ICE mobilisateur ne s'est pas transféré. Ainsi le MGI peut être maintenu et faire bénéficier son hôte d'avantages sélectifs éventuels, tout en gardant la possibilité d'une future mobilisation si un ICE SXT/R391 parvenait ultérieurement dans la même cellule.

L'excision des MGI est activée par SetCD et leur mobilisation se fait à l'aide des protéines de transfert des ICE SXT/R391, codées par des gènes également activés par SetCD. SetCD étant exprimé en contexte de réponse SOS chez la bactérie, toute activation de la réponse SOS chez l'hôte devrait favoriser l'excision et le transfert des MGI. Mes résultats ont effectivement démontré une activation de l'excision et du transfert des MGI en présence de mitomycine C, un agent causant des dommages à l'ADN, ce qui a pour conséquence d'induire la réponse SOS. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que toute exposition à un agent inducteur de la réponse SOS, tels que les rayons UV ou la présence de certains antibiotiques comme la ciprofloxacine, entraîne une activation de la mobilisation des MGI.

3.2. Mobilisation d'ADN chromosomique et impact sur l'évolution des génomes bactériens

Il arrive que le transfert conjugatif d'un ICE se fasse sans qu'il soit préalablement excisé du chromosome. Ce phénomène découvert chez SXT se fait d'une façon similaire au transfert chromosomique dit « Hfr » (« *High frequency of recombination* ») par le plasmide F (Hochhut *et al.*, 2000). Le relaxosome reconnaît l'*oriT* sur l'ICE intégré au chromosome et amorce le transfert du brin porteur du site de coupure au travers du pore de conjugaison. Le transfert de SXT étant unidirectionnel, seule la partie située en aval de l'*oriT* est transférée. Puisque l'ICE est toujours intégré dans le chromosome, il n'y a aucune raison pour que le transfert de celui-ci s'arrête au niveau du site *attR*; par conséquent, une partie du chromosome de la cellule hôte peut être co-transférée avec l'ICE. Une fois dans la cellule réceptrice, l'absence de site *attP* implique que l'ICE doit s'intégrer dans le chromosome d'une façon autre que par intégration site-spécifique, c'est-à-dire probablement par recombinaison homologue. Mes résultats indiquent que ce mécanisme particulier de mobilisation peut également être initié à partir de l'*oriT* située dans les MGI. L'*oriT* étant orientée en sens inverse chez les MGI, seule la partie en amont de celle-ci sera transférée (c'est-à-dire la région variable 1, l'intégrase et le site *attL*). De la même façon que pour SXT, le transfert d'un large fragment d'ADN chromosomique en amont du site d'intégration des MGI peut être observé. Jusqu'à 1-Mb d'ADN chromosomique peut ainsi être mobilisé par la machinerie conjugative des ICE SXT/R391 à partir de l'*oriT* similaire des MGI. La mobilisation de si grands fragments d'ADN laisse entrevoir l'impact immense que peuvent avoir les ICE et les MGI sur la plasticité génomique de leurs hôtes bactériens. Par exemple, ceux-ci pourraient être responsables de la mobilisation de facteurs de virulence à partir d'une souche pathogène d'une espèce de *Vibrio* vers une souche environnementale. Chez *Vibrio vulnificus* YJ016, de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la virulence de cette souche clinique sont localisés dans la région chromosomique potentiellement mobilisable par MGIV ϕ Ind1 (Fig. 1). Parmi eux on trouve

les opérons *rmlABCD* et *wzABC*, qui seraient impliqués dans la biosynthèse de la capsule (Rahn *et al.*, 1999; Smith et Siebeling, 2003), plusieurs hémolysines (*hly*) et le gène *VV0401* codant pour une protéine de fonction inconnue mais lié aux souches pathogènes de *V. vulnificus* (Rosche *et al.*, 2005).

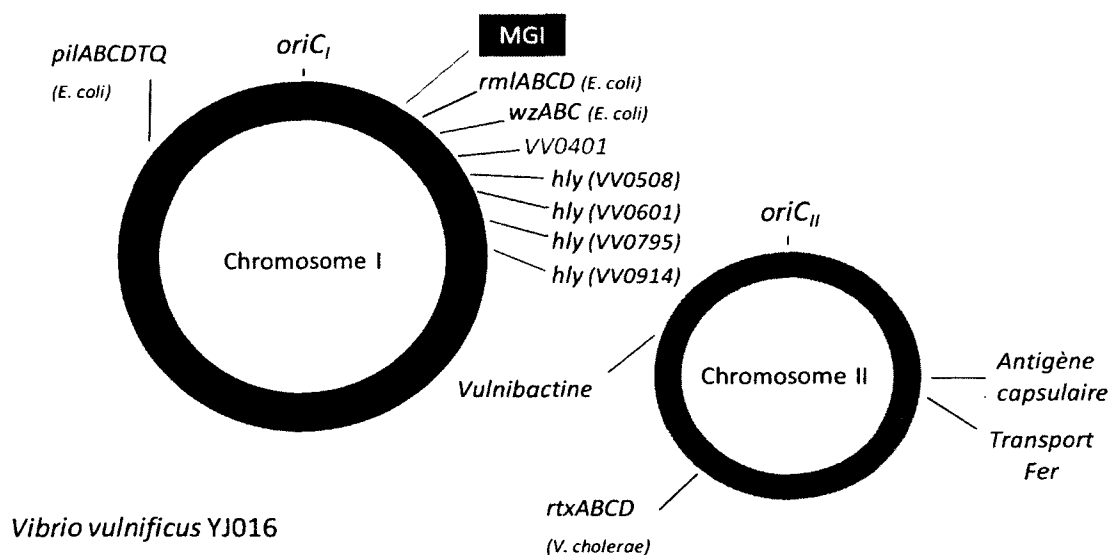


Figure 1. Facteurs de virulence potentiels chez *V. vulnificus* YJ016.

Pour continuer cette partie du projet, il serait intéressant pour un projet futur d'évaluer la possibilité des ICE SXT/R391 de mobiliser de tels facteurs de virulence chez *Vibrio* à partir de l'*oriT* des MGI.

3.3. Avantages sélectifs conférés par les MGI

L'analyse comparative des séquences des différents MGI suggère divers avantages sélectifs que pourraient conférer les MGI à leur hôte. Tout d'abord on retrouve sur la totalité des MGI plusieurs systèmes apparentés au système toxine/antitoxine HipA/HipB de *E. coli*. Ce système est responsable d'un phénomène appelé persistance, qui permet à une certaine partie d'une population bactérienne d'entrer dans un état de dormance qui la protège contre les antibiotiques ciblant des étapes de la croissance bactérienne (Schumacher *et al.*, 2009). Les systèmes toxine/antitoxine présents chez les MGI pourraient également jouer le rôle de systèmes stabilisateurs de ces éléments afin d'éviter leur perte. Ce phénomène a été observé chez SXT avec la présence du système toxine/antitoxine MosA/T (Wozniak et Waldor, 2009). On retrouve également sur la majorité des MGI identifiés jusqu'à présent trois systèmes de restriction/modification distincts. Ces systèmes permettent aux bactéries de reconnaître de l'ADN étranger par rapport à leur propre ADN, leur conférant ainsi une résistance aux phages. Cet avantage sélectif peut être d'autant plus important que les MGI sont jusqu'à présent exclusivement retrouvés dans des bactéries marines, or la prévalence des bacteriophages est particulièrement importante dans les écosystèmes aquatiques (Bergh *et al.*, 1989). Bien que les systèmes de restriction/modification soient habituellement associés à une fonction protectrice pour la bactérie, plusieurs autres fonctions ont également été montrées pour ceux-ci et pourraient être des avenues à explorer pour expliquer la présence de ces systèmes chez les MGI. En effet, certains systèmes associés à des éléments mobiles permettraient leur maintenance (Dziewit *et al.*, 2011) ; d'autre part des études suggèrent que les systèmes de restriction/modification faciliteraient la recombinaison en générant des coupures double brin dans l'ADN (Kobayashi, 2001). Finalement, un MGI présente un gène codant pour une diguanylate cyclase/phosphodiesterase putative. Deux diguanylates cyclases ont également été identifiées sur certains ICE de la famille SXT/R391 (Bordeleau *et al.*, 2010). Les diguanylates cyclases et les phosphodiesterases sont impliquées dans la synthèse et la

dégradation du second messenger c-di-GMP, respectivement. Il a été démontré que des concentrations intracellulaires élevées de ce second messenger favorise la formation de biofilm et diminue la mobilité chez *V. cholerae* (Jenal et Malone, 2006; Romling et Amikam, 2006). En analysant la séquence du gène présent chez MGI/*ch*Hai1 il semble que le motif diguanylate cyclase soit incomplet (GPDEF au lieu de GGDEF), alors que le motif caractéristique des phosphodiesterases est intact (EAL), suggérant une activité phosphodiesterase de la protéine codée par ce gène. La présence de ce gène pourrait donc favoriser la mobilité bactérienne et diminuer la formation de biofilm. La fonctionnalité des systèmes toxine/antitoxine, restriction/modification, et de la diguanylate cyclase/phosphodiesterase putative pourrait être évaluée dans un projet futur afin de démontrer qu'ils représentent bel et bien des avantages sélectifs conférés par les MGI à leur hôte. À mesure que d'autres génomes bactériens seront séquencés, il est très probable que d'autres MGI seront identifiés comportant des gènes inédits dans leurs régions variables qui pourraient apporter encore d'autres avantages aux hôtes des MGI. Par ailleurs, la présence sur les MGI de nombreux gènes de fonction inconnue dans les régions variables pourrait être une autre avenue à explorer afin de trouver d'autres propriétés conférées par ces éléments mobilisables.

3.4. Perspectives du projet

Dans cette étude, l'excision et l'intégration des MGI est apparue comme des mécanismes finement régulés. Pour aller un peu plus loin dans la compréhension de ces mécanismes, après avoir défini les protéines des MGI requises pour catalyser l'excision et l'intégration, il serait intéressant de vérifier l'éventuelle participation de protéines de l'hôte. Plusieurs éléments qui s'excisent et s'intègrent de façon site-spécifique dans le chromosome de leur hôte font appel aux protéines IHF (« *Integration Host Factor* ») et Fis (« *Factor for inversion stimulation* ») (Finkel et Johnson, 1992; Friedman, 1988). Le cas le plus étudié

est celui du phage λ , pour lequel IHF et Fis jouent un rôle aussi bien dans l'excision que dans l'intégration (Esposito et Gerard, 2003; Miller *et al.*, 1979; Miller et Nash, 1981). Le rôle d'IHF a également été montré pour l'intégration et l'excision du phage P2 (Frumerie *et al.*, 2005). Dans le cas du transposon Tn4652 chez *Pseudomonas putida*, IHF et Fis ont une activité antagoniste, IHF favorisant la transposition en jouant un rôle à la fois d'activateur transcriptionnel et de protéine structurale tandis que Fis inhibe ce même phénomène (Teras *et al.*, 2009). Par ailleurs, chez SXT, Fis ne semble jouer aucun rôle dans la recombinaison site-spécifique, tandis qu'IHF joue un rôle dans le transfert conjugatif sans toutefois être directement impliqué dans l'excision (McLeod *et al.*, 2006). La construction de mutants *fis* (codant pour la protéine homodimérique Fis) et *himA* ou *himD* (codant pour la protéine hétérodimérique IHF) permettrait d'évaluer l'importance respective des protéines Fis et IHF dans la recombinaison site-spécifique des MGI.

Alors que le projet a mis en évidence les fonctions respectives de *int* et *rdjM*, il n'a cependant pas permis de déterminer le rôle des gènes *cds4* et *cds8*. La protéine putative codée par *cds4* ne présente aucun domaine conservé de fonction connue et aucune homologie significative avec d'autres protéines connues tandis que la protéine putative codée par *cds8* pourrait avoir une fonction d'hélicase. La délétion de chacun de ces gènes ne semble pas affecter la mobilisation des MGI par les ICE de la famille SXT/R391. Pourtant, la présence de ces deux gènes au sein du squelette de gènes des MGI et leur degré de conservation laissent penser qu'ils ont une réelle utilité aux MGI et il serait intéressant de poursuivre les recherches afin de déterminer leur implication dans la biologie des MGI.

En plus d'apporter une connaissance approfondie d'un nouveau mécanisme de mobilisation d'îlots génomiques, cette étude s'est également intéressée à l'histoire évolutive de ces éléments. De la même façon que pour les ICE de la famille SXT/R391 (Wozniak *et al.*, 2009), il est apparu que les MGI auraient un historique évolutif incluant des événements de

recombinaison entre eux. Pour valider cette hypothèse il serait intéressant pour la continuité de ce projet de vérifier la possibilité des MGI à former des tandems dans leur site d'intégration. Ensuite, la possibilité de formation d'hybrides à partir de ces tandems pourrait être évaluée ainsi qu'une possible implication du système de recombinaison identifié chez les ICE SXT/R391 et apparenté au système Red du phage λ (Garriss *et al.*, 2009).

Grâce à leur petite taille et à leurs propriétés de mobilisation, les MGI pourraient être utilisés comme outils en génie génétique ou servir de modèle pour la construction de MGI synthétiques adaptés à une espèce donnée. Par exemple, ils pourraient permettre d'effectuer des essais de complémentation dans des espèces bactériennes qui acceptent peu ou pas la transformation.

Enfin, la découverte et l'étude du mécanisme de mobilisation des MGI ouvrent une nouvelle porte pour la compréhension des phénomènes de mobilisation des îlots génomiques pour lesquels le mécanisme de transfert demeure inconnu. En effet, maintenant que le mécanisme de mobilisation par imitation de la séquence *oriT* d'un ICE a été découvert, il serait intéressant de rechercher des îlots génomiques présentant une *oriT* similaire à d'autres familles d'ICE ou de plasmides conjugatifs. Nous pourrions, par exemple, rechercher une séquence *oriT* dans les îlots génomiques apparentés au MGI. Par ailleurs, une étude récente a justement démontré la mobilisation d'ADN chromosomique par le plasmide conjugatif R1162 (RSF1010) à partir d'origines de transferts localisées dans le chromosome de *Pectobacterium atrosepticum* (Meyer, 2009). Cette étude, combinée avec mes résultats, suggère que les mécanismes de mobilisation d'îlots génomiques et d'ADN chromosomique par imitation de la séquence *oriT* d'ICE ou de plasmides conjugatifs pourraient être un phénomène répandu. De plus, la découverte de ces mécanismes de mobilisation inédits suggère qu'il existe encore des mécanismes de

mobilisation inconnus et laisse donc présager d'autres découvertes dans ce champ de recherche.

CONCLUSION

Les îlots génomiques sont reconnus pour jouer un rôle important dans la plasticité des génomes bactériens. Leurs caractéristiques générales suggèrent souvent des fonctions de mobilités, et pourtant, les mécanismes de mobilisation d'une petite fraction seulement d'îlots génomiques ont été mis à jour. Mon projet doctoral a permis la reconnaissance d'une nouvelle famille d'îlots génomiques dont les caractéristiques principales sont : (i) une *oriT* similaire à l'*oriT* des ICE de la famille SXT/R391 qui leur permet d'être mobilisés par ces derniers, (ii) des sites d'attachements *attL* et *attR*, (iii) une intégrase très conservée de type P4 ainsi qu'un RDF et deux autres gènes conservés de fonction inconnue, et (iv) leur intégration dans un gène codant pour une protéine conservée de fonction inconnue. Mon projet a démontré que les îlots génomiques appartenant à cette famille sont des îlots génomiques mobilisables (MGI) par les ICE de la famille SXT/R391 grâce à la reconnaissance spécifique de leur *oriT* similaire, et en l'absence de protéines de mobilisations codées par les MGI. Ce mécanisme constitue un mécanisme de mobilisation inédit.

La caractérisation de ce nouveau mécanisme de mobilisation apporte une meilleure compréhension des mécanismes pouvant être impliqués dans la mobilisation d'îlots génomiques ainsi que d'ADN chromosomique. Par ailleurs ce projet pourrait permettre la compréhension du mécanisme de transfert d'autres îlots génomiques. Enfin, compte tenu de la prépondérance des îlots génomiques au sein des chromosomes bactériens et connaissant leur implication parfois majeure dans la pathogénicité, notamment des espèces de *Vibrio*, il apparaît évident que mieux comprendre les mécanismes qui régissent le transfert horizontal des îlots génomiques ouvre de nouvelles portes pour la compréhension de la plasticité des génomes bactériens.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed, A.M., Nakagawa, T., Arakawa, E., Ramamurthy, T., Shinoda, S., and Shimamoto, T. (2004). New aminoglycoside acetyltransferase gene, aac(3)-Id, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months. *J Antimicrob Chemoth* 53, 947-951.

Ahmed, A.M., Shinoda, S., and Shimamoto, T. (2005). A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiol Lett* 242, 241-247.

Alice, A.F., Naka, H., and Crosa, J.H. (2008). Global gene expression as a function of the iron status of the bacterial cell: influence of differentially expressed genes in the virulence of the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 76, 4019-4037.

Almagro-Moreno, S., Napolitano, M.G., and Boyd, E.F. (2010). Excision dynamics of *Vibrio* pathogenicity island-2 from *Vibrio cholerae*: role of a recombination directionality factor VefA. *BMC microbiology* 10, 306.

Auchtung, J.M., Lee, C.A., Monson, R.E., Lehman, A.P., and Grossman, A.D. (2005). Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12554-12559.

Austin, B., and Austin, D.A. (1999). *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*, 3rd edition. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.

Austin, B., Pride, A.C., and Rhodie, G.A. (2003). Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *J Fish Dis* 26, 55-58.

Bach, S., de Almeida, A., and Carniel, E. (2000). The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* 183, 289-294.

Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, G.L., and Pruzzo, C. (2006). Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. *Environ Microbiol* 8, 1299-1305.

Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2002). Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 184, 4259-4269.

Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72-74.

Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymège, A., Decaris, B., and Guedon, G. (2011). Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to cis mobilization and gene capture. *Mol Microbiol* 81, 912-925.

Bellet, J., Klein, B., Altieri, M., and Ochsenschlager, D. (1989). *Vibrio fluvialis*, an unusual pediatric enteric pathogen. *Pediatr Emerg Care* 5, 27-28.

Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G., and Heldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340, 467-468.

Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D.N., Wykstra, D.L., *et al.* (1999). Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel *Vibrio* Study Group. *Lancet* 354, 1421-1424.

Blokesch, M. (2007). Serogroup Conversion of *Vibrio cholerae* in Aquatic Reservoirs. *PLOS Pathogens* 3, e81.

Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H., and Hacker, J. (1994). Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62, 606-614.

Bordeleau, E., Brouillette, E., Robichaud, N., and Burrus, V. (2010). Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environmental microbiology* 12, 510-523.

Boyd, D., Cloeckaert, A., Chaslus-Dancla, E., and Mulvey, M.R. (2002). Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1714-1722.

Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., and Mulvey, M.R. (2001). Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol* 183, 5725-5732.

Boyd, D.A., Peters, G.A., Ng, L., and Mulvey, M.R. (2000). Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 189, 285-291.

Brasch, M.A., and Cohen, S.N. (1993). Excisive recombination of the SLP1 element in *Streptomyces lividans* is mediated by Int and enhanced by Xis. *J Bacteriol* 175, 3075-3082.

Buchanan-Wollaston, V., Passiatore, J.E., and Canon, F. (1987). The *mob* and *oriT* functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. *Nature* 328, 172-175.

Buchrieser, C., Prentice, M., and Carniel, E. (1998). The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. *J Bacteriol* 180, 2321-2329.

Burrus, V., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2006). The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* 55, 173-183.

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., and Guedon, G. (2002). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46, 601-610.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2003). Control of SXT integration and excision. *J Bacteriol* 185, 5045-5054.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004a). Formation of SXT tandem arrays and SXT-R391 hybrids. *J Bacteriol* 186, 2636-2645.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004b). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* 155, 376-386.

Cali, S., Spoldi, E., Piazzolla, D., Dodd, I.B., Forti, F., Deho, G., and Ghisotti, D. (2004). Bacteriophage P4 Vis protein is needed for prophage excision. *Virology* 322, 82-92.

Carniel, E. (2001). The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect* 3, 561-569.

Cascales, E., and Christie, P.J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 1, 137-149.

Ceccarelli, D., Daccord, A., Rene, M., and Burrus, V. (2008). Identification of the origin of transfer (oriT) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *Journal of bacteriology* 190, 5328-5338.

Chakraborty, R., Chakraborty, S., De, K., Sinha, S., Mukhopadhyay, A.K., Khanam, J., Ramamurthy, T., Takeda, Y., Bhattacharya, S.K., and Nair, G.B. (2005). Cytotoxic and cell vacuolating activity of *Vibrio fluvialis* isolated from paediatric patients with diarrhoea. *J Med Microbiol* 54, 707-716.

Chowdhury, N.R., Chakraborty, S., Ramamurthy, T., Nishibuchi, M., Yamasaki, S., Takeda, Y., and Nair, G.B. (2000). Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg Infect Dis* 6, 631-636.

Chowdhury, N.R., Stine, O.C., Morris, J.G., and Nair, G.B. (2004). Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 42, 1280-1282.

Cloeckaert, A., Sidi Boumedine, K., Flaujac, G., Imberechts, H., D'Hooghe, I., and Chaslus-Dancla, E. (2000). Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the floR gene in *S. enterica* serovar agona. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1359-1361.

Coddeville, M., and Ritzenthaler, P. (2010). Control of directionality in bacteriophage mv4 site-specific recombination: functional analysis of the Xis factor. *J Bacteriol* 192, 624-635.

Coetzee, J.N., Datta, N., and Hedges, R.W. (1972). R factors from *Proteus rettgeri*. *J Gen Microbiol* 72, 543-552.

Colwell, R.R., Huq, A., Islam, M.S., Aziz, K.M., Yunus, M., Khan, N.H., Mahmud, A., Sack, R.B., Nair, G.B., Chakraborty, J., *et al.* (2003). Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1051-1055.

Daccord, A., Ceccarelli, D., and Burrus, V. (2010). Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Mol Microbiol* 78, 576-588.

Daccord, A., Ceccarelli, D., Rodrigue, S., and Burrus, V. (2012a). Comparative Analysis of Mobilizable Genomic Islands. *J Bacteriol* [Epub ahead of print].

Daccord, A., Mursell, M., Poulin-Laprade, D., and Burrus, V. (2012b). Dynamics of the SetCD-Regulated Integration and Excision of Genomic Islands Mobilized by Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 Family. *J Bacteriol* 194, 5794-5802.

Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruse, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M., *et al.* (2000a). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect Dis* 181, 1661-1666.

Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A.L., 2nd, Del Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, M.A., Puhr, N.D., *et al.* (2000b). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *Jama* 284, 1541-1545.

Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* 12, 9-16.

DePaola, A., Capers, G.M., and Alexander, D. (1994). Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf Coast. *Appl Environ Microbiol* 60, 984-988.

DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., and Cook, D.W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol* 66, 4649-4654.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2, 414-424.

Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.

Douard, G., Praud, K., Cloeckert, A., and Doublet, B. (2010). The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *PLoS One* 5, e15302.

Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M.R., and Cloeckert, A. (2005). The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol* 55, 1911-1924.

Doublet, B., Lailier, R., Meunier, D., Brisabois, A., Boyd, D., Mulvey, M.R., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckert, A. (2003). Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic

resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerg Infect Dis* 9, 585-591.

Doublet, B., Weill, F.X., Fabre, L., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckaert, A. (2004). Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-Id*, in *Salmonella enterica* serovar newport. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3806-3812.

Dubnau, D. (1999). DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 53, 217-244.

Dziewit, L., Kuczkowska, K., Adamczuk, M., Radlinska, M., and Bartosik, D. (2011). Functional characterization of the type II *PamI* restriction-modification system derived from plasmid *pAMI7* of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686. *FEMS Microbiol Lett* 324, 56-63.

Ebner, P., Garner, K., and Mathew, A. (2004). Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island *SGI1* in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. *J Antimicrob Chemother* 53, 1004-1009.

Esposito, D., and Gerard, G.F. (2003). The *Escherichia coli* *Fis* protein stimulates bacteriophage lambda integrative recombination in vitro. *J Bacteriol* 185, 3076-3080.

Faruque, S.M., Albert, M.J., and Mekalanos, J.J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1301-1314.

Faruque, S.M., Biswas, K., Udden, S.M., Ahmad, Q.S., Sack, D.A., Nair, G.B., and Mekalanos, J.J. (2006). Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6350-6355.

Faruque, S.M., and Mekalanos, J.J. (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends Microbiol* 11, 505-510.

Faruque, S.M., Sack, D.A., Sack, R.B., Colwell, R.R., Takeda, Y., and Nair, G.B. (2003). Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1304-1309.

Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect* 2, 1651-1660.

Finkel, S.E., and Johnson, R.C. (1992). The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol Microbiol* 6, 3257-3265.

Fricke, W.F., Welch, T.J., McDermott, P.F., Mammel, M.K., LeClerc, J.E., White, D.G., Cebula, T.A., and Ravel, J. (2009). Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *J Bacteriol* 191, 4750-4757.

Friedman, D.I. (1988). Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* 55, 545-554.

Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3, 722-732.

Frumerie, C., Sylwan, L., Ahlgren-Berg, A., and Haggard-Ljungquist, E. (2005). Cooperative interactions between bacteriophage P2 integrase and its accessory factors IHF and Cox. *Virology* 332, 284-294.

Furniss, A.L., Lee, J.V., and Donovan, T.J. (1977). Group F, a new *Vibrio*? *Lancet* 2, 565-566.

Gaffney, D.F., Cundliffe, E., and Foster, T.J. (1981). Chloramphenicol resistance that does not involve chloramphenicol acetyltransferase encoded by plasmids from gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 125, 113-121.

Gal-Mor, O., and Finlay, B.B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8, 1707-1719.

Garcia-Martinez, J., Acinas, S.G., Massana, R., and Rodriguez-Valera, F. (2002). Prevalence and microdiversity of *Alteromonas macleodii*-like microorganisms in different oceanic regions. *Environ Microbiol* 4, 42-50.

Garriss, G., Waldor, M.K., and Burrus, V. (2009). Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. *PLoS Genet* 5, e1000775.

Gauthier, G., Gauthier, M., and Christen, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International journal of systematic bacteriology* 45, 755-761.

Gogarten, J.P., and Townsend, J.P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* 3, 679-687.

Groisman, E.A., and Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87, 791-794.

Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., and Goebel, W. (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog* 8, 213-225.

Hacker, J., and Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2, 376-381.

Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54, 641-679.

Harris, J.B., LaRocque, R.C., Qadri, F., Ryan, E.T., and Calderwood, S.B. (2012). Cholera. *Lancet* 379, 2466-2476.

Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., *et al.* (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477-483.

Heinemann, J.A., and Sprague, G.F., Jr. (1989). Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 340, 205-209.

Hjeltnes, B., and Roberts, R.J. (1993). Vibriosis. In R J Roberts, N R Bromage, and V Inglis (ed) *Bacterial diseases of fish* Blackwell Scientific, Oxford, United Kingdom.

Hlady, W.G., and Klontz, K.C. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J Infect Dis* 173, 1176-1183.

Hochhut, B., Beaber, J.W., Woodgate, R., and Waldor, M.K. (2001). Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site. *J Bacteriol* 183, 1124-1132.

Hochhut, B., Jahreis, K., Lengeler, J.W., and Schmid, K. (1997). CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria. *J Bacteriol* 179, 2097-2102.

Hochhut, B., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2000). Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* 182, 2043-2047.

Hochhut, B., and Waldor, M.K. (1999). Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into prfC. *Mol Microbiol* 32, 99-110.

Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., and Hacker, J. (2006). Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol* 61, 584-595.

Hoi, L., Larsen, J.L., Dalsgaard, I., and Dalsgaard, A. (1998). Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Appl Environ Microbiol* 64, 7-13.

Hsiao, W.W., Ung, K., Aeschliman, D., Bryan, J., Finlay, B.B., and Brinkman, F.S. (2005). Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands. *PLoS Genet* 1, e62.

Huq, M.I., Alam, A.K., Brenner, D.J., and Morris, G.K. (1980). Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J Clin Microbiol* 11, 621-624.

Iguchi, T., Kondo, S., and Hisatsune, K. (1995). *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol Lett* 130, 287-292.

Isnansetyo, A., and Kamei, Y. (2009). Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of MC21-B, an antibacterial compound produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas phenolica* O-BC30T. *International journal of antimicrobial agents* 34, 131-135.

Ivars-Martinez, E., Martin-Cuadrado, A.B., D'Auria, G., Mira, A., Ferriera, S., Johnson, J., Friedman, R., and Rodriguez-Valera, F. (2008). Comparative genomics of two ecotypes of the marine planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter. *Isme J* 2, 1194-1212.

Janvier, M., and Grimont, P.A. (1995). The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch gamma of Proteobacteria. *Res Microbiol* 146, 543-550.

Jenal, U., and Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* 40, 385-407.

Jones, M.K., and Oliver, J.D. (2009). *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infect Immun* 77, 1723-1733.

Joseph, S.W., Colwell, R.R., and Kaper, J.B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Crit Rev Microbiol* 10, 77-124.

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 33, 376-393.

Kahlke, T., Goesmann, A., Hjerde, E., Willassen, N.P., and Haugen, P. (2012). Unique core genomes of the bacterial family vibrionaceae: insights into niche adaptation and speciation. *BMC genomics* 13, 179.

Kaper, J.B., Morris, J.G., Jr., and Levine, M.M. (1995). Cholera. *Clin Microbiol Rev* 8, 48-86.

Kim, C.M., Park, R.Y., Park, J.H., Sun, H.Y., Bai, Y.H., Ryu, P.Y., Kim, S.Y., Rhee, J.H., and Shin, S.H. (2006). *Vibrio vulnificus* vulnibactin, but not metalloprotease VvpE, is essentially required for iron-uptake from human holotransferrin. *Biol Pharm Bull* 29, 911-918.

Kim, H.G., Han, G.H., Kim, D., Choi, J.S., and Kim, S.W. (2012). Comparative analysis of two types of methanol dehydrogenase from *Methylophaga aminisulfidivorans* MPT grown on methanol. *Journal of basic microbiology* 52, 141-149.

Kobayashi, I. (2001). Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* 29, 3742-3756.

Lavilla-Pitogo, C.R., and de la Pena, L.D. (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164, 337-349.

Lawrence, J.G., and Hendrickson, H. (2005). Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. *Current opinion in microbiology* 8, 572-578.

Le Roux, F., Labreuche, Y., Davis, B.M., Iqbal, N., Mangenot, S., Goarant, C., Mazel, D., and Waldor, M.K. (2011). Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environ Microbiol* 13, 296-306.

Leano, E.M., Lavilla-Pitogo, C.R., and Paner, M.G. (1998). Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* 164, 367-374.

Lee, C.A., Auchtung, J.M., Monson, R.E., and Grossman, A.D. (2007). Identification and characterization of int (integrase), xis (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 66, 1356-1369.

Lee, J.H., Rho, J.B., Park, K.J., Kim, C.B., Han, Y.S., Choi, S.H., Lee, K.H., and Park, S.J. (2004). Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 72, 4905-4910.

Lee, J.V., Shread, P., and Furniss, A.L. (1980). Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp nov (synonym group F vibrios, group EF-6). *Journal of Applied Bacteriology* 50, 73-94.

Lesic, B., Bach, S., Ghigo, J.M., Dobrindt, U., Hacker, J., and Carniel, E. (2004). Excision of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* requires the combined actions of its cognate integrase and Hef, a new recombination directionality factor. *Mol Microbiol* 52, 1337-1348.

Lesic, B., and Carniel, E. (2005). Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 187, 3352-3358.

Lesic, B., Zouine, M., Ducos-Galand, M., Huon, C., Rosso, M.L., Prevost, M.C., Mazel, D., and Carniel, E. (2012). A natural system of chromosome transfer in *Yersinia pseudotuberculosis*. *PLoS Genet* 8, e1002529.

Lewis, J.A., and Hatfull, G.F. (2001). Control of directionality in integrase-mediated recombination: examination of recombination directionality factors (RDFs) including Xis and Cox proteins. *Nucleic Acids Res* 29, 2205-2216.

Li, L.Y., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (1993). Characterization of the mobilization region of a *Bacteroides* insertion element (NBU1) that is excised and transferred by *Bacteroides* conjugative transposons. *J Bacteriol* 175, 6588-6598.

Li, L.Y., Shoemaker, N.B., Wang, G.R., Cole, S.P., Hashimoto, M.K., Wang, J., and Salyers, A.A. (1995). The mobilization regions of two integrated *Bacteroides* elements, NBU1 and NBU2, have only a single mobilization protein and may be on a cassette. *J Bacteriol* 177, 3940-3945.

Lightner, D.V., and Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201-220.

Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., and Novick, R.P. (1998). The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 29, 527-543.

MacDonnell, M.T., and Colwell, R.R. (1985). Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation of two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 171-182.

Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T. (2003). Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J Mol Biol* 326, 21-33.

Mahmud, Z.H., Neogi, S.B., Kassu, A., Mai Huong, B.T., Jahid, I.K., Islam, M.S., and Ota, F. (2008). Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS Microbiol Ecol* 64, 209-218.

Maiques, E., Ubeda, C., Tormo, M.A., Ferrer, M.D., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2007). Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *J Bacteriol* 189, 5608-5616.

Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., DePaola, A., Ishibashi, M., Shimada, K., Nishibuchi, M., and Liebana, E. (2004). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J Clin Microbiol* 42, 4672-4678.

Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.C., Depaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J., *et al.* (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *J Clin Microbiol* 38, 578-585.

- McLeod, S.M., Burrus, V., and Waldor, M.K. (2006). Requirement for *Vibrio cholerae* integration host factor in conjugative DNA transfer. *J Bacteriol* 188, 5704-5711.
- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.Y., and Schoolnik, G.K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310, 1824-1827.
- Meunier, D., Boyd, D., Mulvey, M.R., Baucheron, S., Mammina, C., Nastasi, A., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckaert, A. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi B. *Emerg Infect Dis* 8, 430-433.
- Meyer, R. (2009). The r1162 mob proteins can promote conjugative transfer from cryptic origins in the bacterial chromosome. *J Bacteriol* 191, 1574-1580.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., and Hacker, J. (2004). Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* 186, 3086-3096.
- Miller, H.I., Kikuchi, A., Nash, H.A., Weisberg, R.A., and Friedman, D.I. (1979). Site-specific recombination of phage λ : the role of host gene products. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 43, 1121-1126.
- Miller, H.I., and Nash, H.A. (1981). Direct role of the himA gene product in phage lambda integration. *Nature* 290, 523-526.
- Mir-Sanchis, I., Martinez-Rubio, R., Marti, M., Chen, J., Lasa, I., Novick, R.P., Tormo-Mas, M.A., and Penades, J.R. (2012). Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision. *Mol Microbiol* 85, 833-845.
- Mulvey, M.R., Boyd, D., Cloeckaert, A., Ahmed, R., and Ng, L.K. (2004). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella Paratyphi* B dT+, Canada. *Emerg Infect Dis* 10, 1307-1310.
- Murata, T., Ohnishi, M., Ara, T., Kaneko, J., Han, C.G., Li, Y.F., Takashima, K., Nojima, H., Nakayama, K., Kaji, A., *et al.* (2002). Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1: implications for evolution of large plasmid genomes. *J Bacteriol* 184, 3194-3202.
- Murphy, R.A., and Boyd, E.F. (2008). Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J Bacteriol* 190, 636-647.
- Myatt, D.C., and Davis, G.H. (1989). Isolation of medically significant *Vibrio species* from riverine sources in south east Queensland. *Microbios* 60, 111-123.

Nishibuchi, M., and Kaper, J.B. (1995). Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun* 63, 2093-2099.

Novick, R.P., Christie, G.E., and Penades, J.R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8, 541-551.

O'Neill, K.R., Jones, S.H., and Grimes, D.J. (1992). Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. *Appl Environ Microbiol* 58, 3257-3262.

Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299-304.

Ochman, H., Lerat, E., and Daubin, V. (2005). Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 Suppl 1, 6595-6599.

Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S.L., Janda, J.M., and Nishibuchi, M. (1997a). Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol* 35, 1965-1971.

Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Garg, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., and Nishibuchi, M. (1997b). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol* 35, 3150-3155.

Okura, M., Osawa, R., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H. (2005). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction. *J Clin Microbiol* 43, 3533-3536.

Oliver, J.D. (2005). Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol Infect* 133, 383-391.

Oliver, J.D. (2006). *Vibrio vulnificus*. In S Belkin, and RR Colwell (ed), *Ocean and Health: pathogens in the marine environment* Springer Science, New York, NY, 253-276.

Oliver, J.D., and Kaper, J.B. (2007). *Vibrio* species. In MP Doyle and LR Beuchat (ed), Food microbiology: fundamentals and frontiers, 3rd ed ASM Press, Washington, DC, 343-379.

Olsson, C., Olofsson, T., Ahrne, S., and Molin, G. (2003). The *Yersinia* HPI is present in *Serratia liquefaciens* isolated from meat. Letters in applied microbiology 37, 275-280.

Osorio, C.R., Marrero, J., Wozniak, R.A., Lemos, M.L., Burrus, V., and Waldor, M.K. (2008). Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a fish-pathogen-derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. J Bacteriol 190, 3353-3361.

Park, K.S., Iida, T., Yamaichi, Y., Oyagi, T., Yamamoto, K., and Honda, T. (2000). Genetic characterization of DNA region containing the trh and ure genes of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 68, 5742-5748.

Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Okada, K., Iida, T., and Honda, T. (2004). Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 72, 6659-6665.

Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T., *et al.* (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. Nature 413, 848-852.

Pembroke, J.T., and Piterina, A.V. (2006). A novel ICE in the genome of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1: comparison with the SXT/R391 ICE-like elements. FEMS Microbiol Lett 264, 80-88.

Petermann, S.R., Sherwood, J.S., and Logue, C.M. (2008). The *Yersinia* high pathogenicity island is present in *Salmonella enterica* Subspecies I isolated from turkeys. Microb Pathog 45, 110-114.

Piazzolla, D., Cali, S., Spoldi, E., Forti, F., Sala, C., Magnoni, F., Deho, G., and Ghisotti, D. (2006). Expression of phage P4 integrase is regulated negatively by both Int and Vis. The Journal of general virology 87, 2423-2431.

Quirke, A.M., Reen, F.J., Claesson, M.J., and Boyd, E.F. (2006). Genomic island identification in *Vibrio vulnificus* reveals significant genome plasticity in this human pathogen. Bioinformatics 22, 905-910.

- Rahn, A., Drummelsmith, J., and Whitfield, C. (1999). Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 181, 2307-2313.
- Rajanna, C., Wang, J., Zhang, D., Xu, Z., Ali, A., Hou, Y.M., and Karaolis, D.K. (2003). The *vibrio* pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholerae* forms precise extrachromosomal circular excision products. *J Bacteriol* 185, 6893-6901.
- Ralph, A., and Currie, B.J. (2007). *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* necrotising fasciitis in fishermen visiting an estuarine tropical northern Australian location. *J Infect* 54, e111-114.
- Reen, F.J., Almagro-Moreno, S., Ussery, D., and Boyd, E.F. (2006). The genomic code: inferring Vibrionaceae niche specialization. *Nat Rev Microbiol* 4, 697-704.
- Reynaud, Y., Saulnier, D., Mazel, D., Goarant, C., and Le Roux, F. (2008). Correlation between detection of a plasmid and high-level virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Appl Environ Microbiol* 74, 3038-3047.
- Rhee, J.E., Rhee, J.H., Ryu, P.Y., and Choi, S.H. (2002). Identification of the *cadBA* operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol Lett* 208, 245-251.
- Romling, U., and Amikam, D. (2006). Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current opinion in microbiology* 9, 218-228.
- Rosche, T.M., Yano, Y., and Oliver, J.D. (2005). A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiology and immunology* 49, 381-389.
- Ruzin, A., Lindsay, J., and Novick, R.P. (2001). Molecular genetics of *SaPI1*--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 41, 365-377.
- Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., and Li, L.Y. (1995a). In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. *J Bacteriol* 177, 5727-5731.
- Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M., and Li, L.Y. (1995b). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* 59, 579-590.

Savinov, A., Pan, J., Ghosh, P., and Hatfull, G.F. (2012). The Bxb1 gp47 recombination directionality factor is required not only for prophage excision, but also for phage DNA replication. *Gene* 495, 42-48.

Schmidt, H., and Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17, 14-56.

Schubert, S., Dufke, S., Sorsa, J., and Heesemann, J. (2004a). A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol Microbiol* 51, 837-848.

Schubert, S., Rakin, A., and Heesemann, J. (2004b). The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* 294, 83-94.

Schumacher, M.A., Piro, K.M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., and Brennan, R.G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323, 396-401.

Scott, J.R., Bringel, F., Marra, D., Van Alstine, G., and Rudy, C.K. (1994). Conjugative transposition of Tn916: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate. *Mol Microbiol* 11, 1099-1108.

Sherburne, C.K., Lawley, T.D., Gilmour, M.W., Blattner, F.R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D.J., and Taylor, D.E. (2000). The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res* 28, 2177-2186.

Shoemaker, N.B., Wang, G.R., and Salyers, A.A. (2000). Multiple gene products and sequences required for excision of the mobilizable integrated *Bacteroides* element NBU1. *J Bacteriol* 182, 928-936.

Smith, A.B., and Siebeling, R.J. (2003). Identification of genetic loci required for capsular expression in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 71, 1091-1097.

Smith, C.J., and Parker, A.C. (1993). Identification of a circular intermediate in the transfer and transposition of Tn4555, a mobilizable transposon from *Bacteroides* spp. *J Bacteriol* 175, 2682-2691.

Srinivasan, V.B., Virk, R.K., Kaundal, A., Chakraborty, R., Datta, B., Ramamurthy, T., Mukhopadhyay, A.K., and Ghosh, A. (2006). Mechanism of drug resistance in clonally

related clinical isolates of *Vibrio fluvialis* isolated in Kolkata, India. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2428-2432.

Stevens, A.M., Sanders, J.M., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (1992). Genes involved in production of plasmidlike forms by a *Bacteroides* conjugal chromosomal element share amino acid homology with two-component regulatory systems. *J Bacteriol* 174, 2935-2942.

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., *et al.* (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184, 3086-3095.

Sun, J., Inouye, M., and Inouye, S. (1991). Association of a retroelement with a P4-like cryptic prophage (retronphage phi R73) integrated into the selenocystyl tRNA gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 4171-4181.

Swenson, D.L., Bukanov, N.O., Berg, D.E., and Welch, R.A. (1996). Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infect Immun* 64, 3736-3743.

Tamplin, M., Rodrick, G.E., Blake, N.J., and Cuba, T. (1982). Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. *Appl Environ Microbiol* 44, 1466-1470.

Teras, R., Jakovleva, J., and Kivisaar, M. (2009). Fis negatively affects binding of Tn4652 transposase by out-competing IHF from the left end of Tn4652. *Microbiology* 155, 1203-1214.

Thompson, F.L., and Swings, J.G. (2006). Taxonomy of the *Vibrios*. In *The Biology of Vibrios*, F.L. Thompson, B. Austin, and J.G. Swings, eds. (Washington, DC: ASM Press), pp. 29-43.

Tormo-Mas, M.A., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S.M., Campoy, S., Lasa, I., Barbe, J., Novick, R.P., Christie, G.E., and Penades, J.R. (2010). Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature* 465, 779-782.

Tormo, M.A., Ferrer, M.D., Maiques, E., Ubeda, C., Selva, L., Lasa, I., Calvete, J.J., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2008). *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J Bacteriol* 190, 2434-2440.

Ubeda, C., Barry, P., Penades, J.R., and Novick, R.P. (2007). A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14182-14188.

Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003). Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49, 193-210.

Viana, D., Blanco, J., Tormo-Mas, M.A., Selva, L., Guinane, C.M., Baselga, R., Corpa, J.M., Lasa, I., Novick, R.P., Fitzgerald, J.R., *et al.* (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol Microbiol* 77, 1583-1594.

Waldor, M.K. (2010). Mobilizable genomic islands: going mobile with *oriT* mimicry. *Mol Microbiol* 78, 537-540.

Waldor, M.K., Tschape, H., and Mekalanos, J.J. (1996). A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* 178, 4157-4165.

Watnick, P.I., and Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* 34, 586-595.

Welch, T.J., Fricke, W.F., McDermott, P.F., White, D.G., Rosso, M.L., Rasko, D.A., Mammel, M.K., Eppinger, M., Rosovitz, M.J., Wagner, D., *et al.* (2007). Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One* 2, e309.

Wong, H.C., Liu, S.H., Wang, T.K., Lee, C.L., Chiou, C.S., Liu, D.P., Nishibuchi, M., and Lee, B.K. (2000). Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol* 66, 3981-3986.

Wozniak, R.A., Fouts, D.E., Spagnoletti, M., Colombo, M.M., Ceccarelli, D., Garriss, G., Dery, C., Burrus, V., and Waldor, M.K. (2009). Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet* 5, e1000786.

Wozniak, R.A., and Waldor, M.K. (2009). A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet* 5, e1000439.

Wozniak, R.A., and Waldor, M.K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 8, 552-563.

Wright, A.C., Hill, R.T., Johnson, J.A., Roshman, M.C., Colwell, R.R., and Morris, J.G., Jr. (1996). Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 62, 717-724.

Yeung, P.S., and Boor, K.J. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathog Dis* 1, 74-88.

Yildiz, F.H., and Schoolnik, G.K. (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4028-4033.

Zhang, X.H., and Austin, B. (2005). Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol* 98, 1011-1019.